



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGÉLICA VIEIRA DA SILVA BERTONCELLO SOUZA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO *Trametes* sp. PARA A
BIORREMEDIAÇÃO DE BISFENOL A EM MEIO AQUOSO**

CURITIBA

2017

ANGÉLICA VIEIRA DA SILVA BERTONCELLO SOUZA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO FUNGO *Trametes* sp. PARA A
BIORREMEDIAÇÃO DE BISFENOL A EM MEIO AQUOSO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Meio Ambiente Urbano e Industrial, no Programa de Pós-Graduação Profissional em Meio Ambiente Urbano e Industrial, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná em parceria com o SENAI-PR e a Universität Stuttgart, Alemanha.

Orientador: Prof. Dr. Jörg Wolfgang Metzger
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a Arislete Dantas de Aquino
Prof. Dr. José Domingos Fontana

CURITIBA

2017

S729

Souza, Angélica Vieira da Silva Bertoncello.

Otimização da produção de lacase pelo fungo *Trametes sp.* para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso. Curitiba, 2017.
143 f.: il.; tab., graf.

Orientador: Dr. Jörg Wolfgang Metzger; Co-Orientadores:

Dra. Arislete Dantas de Aquino, Dr. José Domingos Fontana.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-graduação em Meio Ambiente Urbano e Industrial.

1. Enzimas de fungos. 2. Fungos cultura e meios de cultura.
3. Espectrofotometria. 4. Lignina. I. Metzger, Jörg Wolfgang.
II. Aquino, Arislete Dantas de. III. Fontana, José Domingos.
IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 577.15



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação MEIO AMBIENTE URBANO E INDUSTRIAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEIO AMBIENTE URBANO E INDUSTRIAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANGELICA VIEIRA DA SILVA BERTONCELLO SOUZA** intitulada: **Otimização da produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Agosto de 2017.

JOERG WOLFGANG METZGER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

KAREN JULIANA DO AMARAL
Avaliador Externo (UFPR)

NADIA KRIEGER
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esta dissertação ao meu querido esposo Hermes Jr. que sempre está ao meu lado, me apoiando, motivando, ensinando e acreditando nos meus ideais, com muito amor e paciência. Sem você esta conquista não teria se concretizado!

Também dedico à minha mãe Lúcia que ao longo da vida tem me ensinado tantas lições, me apoiando e motivando nos momentos difíceis. Bem como à minha irmã Alehssa que também acompanhou de perto esta minha jornada, ambas sempre prontas para suavizar os dias ruins com um café e uma boa conversa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, sabedoria e me acompanhar ao longo da jornada da vida, nunca me deixando desistir dos meus sonhos e ideais.

Aos meus amigos e familiares que sempre me incentivaram e compreenderam a minha ausência em tantos momentos.

Ao grande mestre e amigo Prof. Dr. José D. Fontana que acreditou em meu potencial, e viabilizou a execução deste projeto. Muito obrigada pela sua orientação, generosidade, conhecimento e parceria.

Ao Prof. Dr. Jörg W. Metzger da Universität Stuttgart, Alemanha, que apesar da distância sempre esteve presente, algumas vezes fisicamente, outras tantas virtualmente, sempre me motivando, ensinando e orientando.

À Prof^a. Dr^a. Arislete D. de Aquino também por sua orientação e ensinamentos ao longo deste projeto.

Aos queridos colegas do laboratório LQBB – UTFPR: Bárbara Chalcoski, Dr^a Cibelle Dallagassa, Dr^a Heide Koop, Juliana Moreira, Leonardo Pellizzari, Dr^a Marcela Tiboni, Raffael Ferreira e Dr^a Tatiana Zuccolotto pela parceria, amizade, apoio, ensinamentos e solidariedade nos momentos difíceis.

À querida amiga e anjo da guarda Ma. Liliane Sessi que me ajudou a iniciar esta jornada.

Aos colegas de mestrado do PPGMAUI pela amizade, parceria e apoio.

Às Prof^{as}.do PPGMAUI: Dr^a Karen J. do Amaral, Ma. Marielle Feilstrecker, Dr^a Mônica B. Kolicheski e Dr^a Patrícia Charvet pelo apoio didático e humano dado ao longo do caminho.

À Prof. Dr^a. Giselle Maciel e suas alunas Aline Hermann e Dayane Braga, que gentilmente cederam as cepas fúngicas para minha pesquisa, além de compartilharem conhecimentos, e o uso do laboratório de microbiologia da UTFPR.

Ao Dr. Maurício Passos e a Dr^a Maria da Graça Toledo da Central Analítica da Farmácia da UFPR por permitirem o uso do espectrômetro de infravermelho, bem como me auxiliarem em meus questionamentos técnicos.

Às Prof^{as} Dr^a Marlene Soares (UTFPR) e Dr^a Nádia Krieger (UFPR) por gentilmente participarem da banca na defesa desta dissertação, contribuindo grandemente com suas sugestões e conhecimentos.

Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.

Antoine Lavoisier

RESUMO

O bisfenol A (BFA) é um monômero empregado na fabricação de resinas epóxi e plásticos policarbonatados, e também como insumo para outros fins industriais. Este composto é classificado como um interferente endócrino capaz de causar perturbações no sistema endócrino, imunológico e nervoso dos seres vivos, além de causar sérios distúrbios ambientais. Os tratamentos físico-químicos para remoção deste tipo de poluente são dispendiosos. Assim, tratamentos com o emprego de enzimas fúngicas como as lacases podem ser uma alternativa promissora para este fim. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção da enzima lacase por meio do cultivo do fungo *Trametes* sp. com a adição de extratos de lignina bruta e indutores químicos, e sua aplicação na biorremediação de BFA em meio aquoso. O estudo da produção da lacase teve início com a aplicação de seis extratos de lignina bruta de bracatinga, peroba, pinus, bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e casca de trigo, em concentração de 1 g L^{-1} nos experimentos. Os extratos de peroba e bagaço de cana-de-açúcar apresentaram maior potencial indutor frente aos demais, de modo que foram empregados na otimização da produção de lacase por meio de um delineamento de experimentos fatorial fracionário⁵⁻², juntamente com os potenciais indutores químicos: dioxano, siringol e sulfato de cobre, estes na concentração de 1 mmol L^{-1} . A biorremediação do BFA foi realizada pela aplicação de 500 U L^{-1} de lacase bruta em meio tamponado em pH 5 contendo 100 mg L^{-1} do contaminante que foi quantificado por cromatografia líquida (HPLC-DAD). A técnica analítica de espectrofotometria UV-Vis derivativa foi avaliada para a determinação do BFA em solução multicomponente. A faixa de pH ótimo para a lacase foi observada entre os valores de 4 a 6, na qual a atividade enzimática se manteve estável por um período de 72h. O melhor efeito indutor obtido na otimização da produção de lacase ocorreu pela interação dos cinco indutores atingindo uma atividade de $45.185 \pm 321 \text{ U L}^{-1}$ em 24 dias de cultivo. Também ocorreu um forte efeito indutor com os extratos de bagaço de cana-de-açúcar e de peroba juntamente com o CuSO_4 , e com o extrato de peroba, dioxano e CuSO_4 que obtiveram resultados de $35.926 \pm 642 \text{ U L}^{-1}$ e $35.556 \pm 1.111 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente. A biorremediação do BFA pela lacase bruta se mostrou eficiente, sendo que na primeira hora de reação foi reduzida cerca de 50% da concentração inicial, e após 10 h de reação já não foi mais possível detectar a presença do contaminante em solução aquosa. A avaliação da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa foi positiva para a análise do BFA em solução contendo lacase bruta de *Trametes* sp., quando comparada com a técnica de HPLC-DAD.

Palavras-chave: Dioxano. Espectrofotometria UV Vis derivativa. Interferentes endócrinos. Lignina. Siringol.

ABSTRACT

The bisphenol A (BPA) is a monomer widely used in the manufacture of epoxy resins and polycarbonate plastics, and also as an input for other industrial purposes. This compound is classified as an endocrine interferent capable of causing disturbances in the endocrine, immune and nervous system of living beings, besides causing serious environmental disturbances. The physical-chemical treatments for this type of pollutant are quite expensive, so treatments using fungal enzymes, such as laccases, can be a very promising alternative. The objective of this study was to optimize the laccase enzyme production through the cultivation of *Trametes* sp. fungus, with the addition of crude lignin extracts and chemical inducers, and its application in bioremediation of BPA in water base. The laccase production study began by applying six gross lignin extracts of bracatinga wood, peroba wood, pinus wood, sugarcane bagasse, soybean hull and wheat husk, in a concentration of 1 g L^{-1} in the experiments. The extracts of peroba wood and sugarcane bagasse presented higher inductive potential compared to the others, so that they were used in the laccase optimization production through a fractional ⁵⁻² factorial experimental design, along with the potential chemical inducers: dioxane, syringol and copper sulphate 1 mmol L^{-1} concentration. The BPA bioremediation was performed by applying 500 U L^{-1} crude laccase in buffered medium at pH 5 containing 100 mg L^{-1} of the contaminant which was quantified by liquid chromatography (HPLC-DAD). The analytical technique of derivative ultraviolet spectrophotometry was evaluated for BPA determination in multicomponent solution. The optimum pH range for the laccase was observed between the values of 4 to 6, in which the enzymatic activity remained stable for a period of 72h. The best inducing effect on laccase production occurred through the interaction of the five inducers reaching an activity of $45.185 \pm 321 \text{ U L}^{-1}$ in 24 days of cultivation, also a strong inducing effect occurred between the extracts of sugarcane bagasse and peroba together with the CuSO_4 , and between the peroba extract, dioxane and CuSO_4 that obtained results of $35.926 \pm 642 \text{ U L}^{-1}$ and $35.556 \pm 1.111 \text{ U L}^{-1}$, respectively. The BPA bioremediation by the crude laccase was efficient, and in the first hour of reaction, about 50% of the initial concentration was reduced, and after 10 hours of reaction it was no longer possible to detect the presence of the contaminant in the aqueous solution. The evaluation of the derivative ultraviolet spectrophotometry technique was satisfactory for the analysis of the BPA in solution containing *Trametes* sp. crude laccase, when compared with the HPLC-DAD technique.

Key-words: Dioxane. Derivative ultraviolet spectrophotometry. Endocrine disruptors. Lignin. Syringol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - REAÇÃO DE SÍNTESE DE BISFENOL A	29
FIGURA 02 - FLUXOGRAMA GERAL DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	58
FIGURA 03 - MATERIAL LIGNOCELULÓSICO USADO NOS EXPERIMENTOS	59
FIGURA 04 - EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA SECOS	61
FIGURA 05 - <i>PLUGS</i> (5 mm ²) EM INOCULAÇÃO DE <i>Trametes</i> sp. NA ETAPA A	66
FIGURA 06 - INÓCULO (<i>PLUGS</i>) DE <i>Trametes</i> sp. PARA A ETAPA B	68
FIGURA 07 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO ABTS PELA AÇÃO DA LACASE DE <i>Trametes</i> sp.	70
FIGURA 08 - ESPECTROS DO BISFENOL A x LACASE: ORDEM ZERO E 1 ^a ORDEM	74

LISTA DE FÓRMULAS E EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 01 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA U L ⁻¹	69
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 - PRODUÇÃO DE LACASE COM LIGNINAS DO GRUPO MADEIRAS	85
GRÁFICO 02 - PRODUÇÃO DE LACASE COM LIGNINAS DO GRUPO RESÍDUOS AGRÍCOLAS	86
GRÁFICO 03 - PRODUÇÃO DE LACASE COM ADIÇÃO DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO MADEIRAS COM 16 DIAS DE CULTIVO	89
GRÁFICO 04 - PRODUÇÃO DE LACASE COM ADIÇÃO DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO RESÍDUOS AGRÍCOLAS COM 16 DIAS DE CULTIVO	90
GRÁFICO 05 - FATOR INDUTOR DE LACASE OBTIDO PELA ADIÇÃO INDIVIDUALIZADA DOS INDUTORES AO LONGO DE 24 DIAS DE CULTIVO	92
GRÁFICO 06 - DIAGRAMA DE PARETO DAS INTERAÇÕES ENTRE DOIS FATORES NA PRODUÇÃO DE LACASE: 7°, 11°, 16° E 21° DIAS DE CULTIVO	93
GRÁFICO 07 - INTERAÇÕES ENTRE DOIS FATORES NA PRODUÇÃO DE LACASE: 24° DIA.....	94
GRÁFICO 08 - INTERAÇÕES ENTRE DOIS FATORES: 24 DIAS DE CULTIVO.....	95
GRÁFICO 09 - REPRESENTAÇÃO EM CUBO DA INTERAÇÃO ENTRE OS CINCO FATORES	96
GRÁFICO 10 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA EM CONTORNO ENTRE DOIS FATORES	102
GRÁFICO 11 - DEGRADAÇÃO DO BISFENOL A POR LACASE DE <i>Trametes</i> sp..	105

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - MATÉRIAS-PRIMAS PARA A EXTRAÇÃO DE LIGNINA BRUTA	59
QUADRO 02 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A PRODUÇÃO DE LACASE	65
QUADRO 03 - PARÂMETROS DO FATORIAL FRACIONÁRIO ⁵⁻² REALIZADO PARA O <i>Trametes</i> sp.....	67
QUADRO 04 - DADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DO BISFENOL A.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - CONCENTRAÇÕES DE BISFENOL A EM CORPOS HÍDRICOS.....	31
TABELA 02 - ATRIBUIÇÕES DE BANDAS NO INFRAVERMELHO: MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	62
TABELA 03 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO BASE	64
TABELA 04 - CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DOS INDUTORES DE LACASE	64
TABELA 05 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE DE LACASE	69
TABELA 06 - CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA	76
TABELA 07 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA.....	76
TABELA 08 - BANDAS FTIR PARA OS EXTRATOS DE LIGNINA DE MADEIRA, RESÍDUOS AGRÍCOLAS E VALORES RELATADOS NA LITERATURA.....	78
TABELA 09 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA PRODUÇÃO DE LACASE INDUZIDA PELA ADIÇÃO DE EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO MADEIRAS COM 16 DIAS DE CULTIVO	89
TABELA 10 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA PRODUÇÃO DE LACASE INDUZIDA PELA ADIÇÃO DE EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO RESÍDUOS AGRÍCOLAS COM 16 DIAS DE CULTIVO	90
TABELA 11 - ANOVA DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO	91
TABELA 12 - DADOS DO FATORIAL FRACIONÁRIO ⁵⁻² E DA PRODUÇÃO DE LACASE POR <i>Trametes</i> sp. NA ETAPA B	97
TABELA 13 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DESNATURANTE DA ACETONITRILA A 1,2% (V/V)	102
TABELA 14 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DO PH ÓTIMO PARA A ATIVIDADE DA LACASE PRODUZIDA POR <i>Trametes</i> sp.	103

TABELA 15 - ATIVIDADE DA LACASE NO T_{0H} E NO T_{72H} PARA A ESTABILIDADE COM O PH.....	103
TABELA 16 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DA LACASE PRODUZIDA POR <i>Trametes</i> sp. AO PH APÓS 72H DE INCUBAÇÃO	104
TABELA 17 - CONCENTRAÇÕES RESIDUAIS DE BISFENOL A QUANTIFICADAS POR HPLC-DAD E ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS DERIVATIVA E COMPARAÇÃO POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA.....	106
TABELA 18 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA QUANTIFICAÇÃO DE BISFENOL A DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO PELA LACASE.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	- 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACN	- Acetonitrila
BA	- Bracatinga
BC	- Bagaço de cana-de-açúcar
BFA	- Bisfenol A
BFS	- Bisfenol F
CE	- Contaminante emergente
C/N	- Relação carbono/nitrogênio
CS	- Casca de soja
CT	- Casca de trigo
DAD	- Diode array detector
DOE	- Design of experiments
ETA	- Estação de tratamento de água
ETE	- Estação de tratamento de esgoto
HPLC	- High performance liquid chromatography
IARC	- International agency for research on cancer
IE	- Interferente endócrino
LME	- Limite de migração específica
LiP	- Lignina peroxidase
MCOs	- Multicobreoxidasas
MnP	- Manganês peroxidase
PE	- Peroba
PI	- Pinus
RID	- Refractive index detector
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RPM	- Rotações por minuto
UV	- Ultravioleta
UV-Vis	- Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	CONTAMINANTES EMERGENTES.....	23
2.1.1	Interferentes endócrinos	24
2.1.2	Remediação de interferentes endócrinos	26
2.2	BISFENOL A	28
2.2.1	Dados de produção e consumo de bisfenol A	29
2.2.2	Dados de contaminação ambiental por bisfenol A	30
2.2.3	Vias de contaminação ambiental por bisfenol A.....	32
2.2.4	Vias de exposição humana ao bisfenol A	32
2.2.5	Dados de contaminação humana por bisfenol A	33
2.2.6	Função desreguladora do bisfenol A nos organismos.....	34
2.2.7	Métodos analíticos para determinação de bisfenol A.....	35
2.2.7.1	Espectrofotometria derivativa UV-Vis	36
2.3	LEGISLAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES.....	37
2.3.1	Legislações e padrões referentes ao bisfenol A.....	38
2.4	LACASES	39
2.4.1	Indutores para a síntese de lacases	42
2.4.1.1	Dioxano	43
2.4.1.2	Siringol.....	44
2.4.1.3	Sulfato de cobre	44
2.5	BASIDIOMICETOS	45
2.5.1	<i>Trametes</i> sp.	47
2.6	MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	47
2.6.1	Lignina	48
2.6.1.1	Métodos de extração de ligninas	49
2.6.1.2	Análise de ligninas por Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier.....	50
2.6.2	Madeiras.....	51

2.6.2.1	Bracatinga	52
2.6.2.2	Peroba	52
2.6.2.3	Pinus.....	53
2.6.3	Resíduos agrícolas.....	54
2.6.3.1	Bagaço de cana-de-açúcar	54
2.6.3.2	Casca de soja.....	54
2.6.3.3	Casca de trigo	55
2.7	DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS: FATORIAL FRACIONÁRIO	56
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	EXTRAÇÃO DAS LIGNINAS	59
3.1.1	Seleção das matérias-primas para a extração de ligninas	59
3.1.2	Extração de lignina bruta	60
3.1.3	Determinação da concentração dos sólidos solúveis.....	60
3.1.4	Espectrometria no Infravermelho por transformada de Fourier.....	61
3.2	CEPA PRODUTORA DE LACASE	63
3.2.1	Manutenção e ativação da cepa de <i>Trametes</i> sp.....	63
3.3	MEIO DE CULTIVO.....	63
3.4	INDUTORES DE LACASES	64
3.5	CULTIVO E ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LACASE	64
3.5.1	Etapa A: estudo da viabilidade de <i>Trametes</i> sp. e seleção dos extratos de lignina bruta	65
3.5.2	Etapa B: otimização da produção de lacase por <i>Trametes</i> sp. pela aplicação de indutores	67
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE.....	68
3.7	AVALIAÇÃO DO EFEITO DESNATURANTE DA ACETONITRILA	70
3.8	DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO	71
3.9	ESTABILIDADE AO pH.....	71
3.10	METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO BISFENOL A	71
3.10.1	Instrumentação.....	71
3.10.2	Fases móvel e estacionária para HPLC-DAD.....	72
3.10.3	Padrão analítico e solvente cromatográfico.....	72
3.10.4	Elaboração das curvas analíticas do bisfenol A	72
3.10.4.1	Parâmetros de análise e curva analítica para HPLC-DAD	73

3.10.4.2	Parâmetros de análise e curva analítica para espectrofotometria UV-Vis derivativa	73
3.11	BIORREMEDIAÇÃO DO BISFENOL A	74
3.12	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1	EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA	76
4.1.1	Concentração dos extratos de lignina bruta	76
4.1.2	Análise dos extratos de lignina bruta por Espectrometria no Infravermelho por transformada de Fourier	77
4.2	PRODUÇÃO DE LACASE	83
4.2.1	Produção de lacase: Etapa A.....	84
4.2.1.1	Produção de lacase induzida pelo grupo madeiras.....	84
4.2.1.2	Produção de lacase induzida pelo grupo resíduos agrícolas	86
4.2.1.3	Seleção dos extratos de lignina bruta para a etapa B	89
4.2.2	Otimização da produção de lacase: Etapa B.....	91
4.2.2.1	Efeitos principais dos fatores indutores	91
4.2.2.2	Efeito da interação dos fatores indutores: 7°, 11°, 16° e 21° dia de cultivo	92
4.2.2.3	Efeitos das interações dos fatores indutores no 24° dia de cultivo	94
4.3	EFEITO DO SOLVENTE ACETONITRILA NA ATIVIDADE DA LACASE.	102
4.4	pH ÓTIMO E ESTABILIDADE DA LACASE	103
4.5	BIORREMEDIAÇÃO DO BISFENOL A E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS DERIVATIVA	105
4.5.1	Biorremediação quantitativa do bisfenol A.....	105
4.5.2	Avaliação da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa	109
5	CONCLUSÕES	111
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
	REFERÊNCIAS.....	114
	APÊNDICE A – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE BRACATINGA	135
	APÊNDICE B – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE PEROBA	136
	APÊNDICE C – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE PINUS.....	137

APÊNDICE D – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	138
APÊNDICE E – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE CASCA DE SOJA.....	139
APÊNDICE F – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE CASCA DE TRIGO	140
APÊNDICE G – CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO BISFENOL A POR HPLC-DAD.....	141
APÊNDICE H - CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO BISFENOL A POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVATIVA UV-VIS DE PRIMEIRA ORDEM	142
APÊNDICE I - CROMATOGRAMA DA BIORREMEDIAÇÃO DO BFA POR LACASE DE <i>Trametes</i> sp. APÓS 10 H DE REAÇÃO OBTIDO POR HPLC-DAD.....	143

1 INTRODUÇÃO

O acelerado desenvolvimento industrial juntamente com as necessidades de consumo mundial tem gerado grandes avanços na tecnologia de materiais e insumos industriais, os quais muitas vezes contêm compostos químicos com pouca ou nenhuma informação sobre os efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente.

Estes compostos, os chamados contaminantes emergentes, não possuem regulamentação específica, entretanto apresentam riscos à saúde e ao meio ambiente, mesmo em baixas concentrações (PATIÑO et al., 2015). Dentro deste grupo de poluentes está a classe dos contaminantes com ação endócrina, os chamados interferentes endócrinos. Diversos estudos relacionam estes compostos a distúrbios nos sistemas endócrino, imunológico e nervoso dos seres vivos, bem como a severas alterações ambientais, principalmente em sistemas aquáticos (ERKURT, 2015; GARCIA-MORALES et al., 2015; GAVRILESCU et al., 2015; GHISELLI; JARDIM, 2007; SOARES; LEÃO, 2015).

O bisfenol A (BFA) é um interferente endócrino comumente encontrado em recursos hídricos, como rios e lagos, sendo largamente utilizado na indústria como insumo para a fabricação de resinas epóxi e policarbonatos (BERNARDO et al., 2015).

Segundo Sodré (2012) o BFA pode estar presente em águas superficiais em concentrações que variam em até 2 ordens de magnitude, dentro da faixa de ng L^{-1} , e são provenientes de estações de tratamento de efluentes (ETEs), e principalmente de efluentes industriais. O Brasil apresenta um quadro mais crítico quanto à contaminação por poluentes emergentes em água tratada, pois frequentemente o esgoto doméstico é despejado diretamente em corpos hídricos, e as estações de tratamento de água (ETAs) são dotadas apenas de tratamento convencional que é ineficiente para a remoção destes poluentes (DIAS, 2014).

A presença de interferentes endócrinos em cursos de águas naturais representa um sério risco à fauna e à saúde pública, e diante deste cenário diversos experimentos têm sido realizados na tentativa de remover ou mesmo reduzir a toxicidade destas substâncias no meio ambiente.

A maior parte dos processos físico-químicos envolvidos na remoção de contaminantes emergentes, como os interferentes endócrinos, demanda um elevado

custo de implantação e operação. Deste modo, vem se destacando nas últimas décadas uma nova alternativa de tratamento no ramo da biotecnologia: a biorremediação, que é uma forma de tratamento na qual são empregadas plantas, algas, microrganismos e suas enzimas que são capazes de remediar total ou parcialmente alguns tipos de contaminantes, com uma relação custo-benefício atrativa.

A espécie de basidiomiceto *Trametes* sp. durante seu metabolismo produz enzimas extracelulares lignocelulolíticas, como as lacases, que são capazes de degradar diversos compostos fenólicos e não-fenólicos considerados recalcitrantes no meio ambiente (DAASSI et al., 2013; NYANHONGO et al., 2007; SI; PENG; CUI, 2013). O cultivo desta espécie é relativamente simples, podendo ser empregados como substrato diversos materiais lignocelulósicos, inclusive de resíduos agrícolas e cavacos de madeiras.

A forma e a composição do substrato lignocelulósico determinam o tipo e a concentração das enzimas produzidas por estes fungos. Alguns fatores físico-químicos também podem induzir a síntese destas enzimas, como a temperatura, o pH, as fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas, e a aplicação de indutores químicos, entre outros (ELISASHVILI et al., 2006, 2008; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005).

Este trabalho teve como propósito avaliar a biorremediação do BFA em meio aquoso pela aplicação de lacases brutas extraídas durante o cultivo submerso do fungo *Trametes* sp., bem como determinar o potencial indutor na produção de lacases de extratos de lignina bruta obtidos a partir de resíduos agrícolas, como bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e casca de trigo, e de cavacos das madeiras bracatinga, peroba e pinus.

Por meio de um delineamento de experimentos foram avaliados os efeitos das interações entre os extratos de lignina bruta e os compostos químicos dioxano, siringol e sulfato de cobre, na indução da síntese de lacase por esta espécie.

A viabilidade do emprego da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa para a determinação do BFA em solução contendo lacase foi avaliada por meio de comparação de resultados com a técnica de cromatografia líquida de alta performance.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Otimizar a produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) avaliar o potencial indutor das ligninas extraídas de três tipos de madeiras e de três tipos de resíduos agrícolas na produção da enzima lacase pelo fungo *Trametes* sp.
- b) otimizar a produção da lacase por *Trametes* sp. pela aplicação de indutores químicos, como sulfato de cobre, dioxano e siringol, concomitantemente com as duas ligninas com maior potencial indutor obtidas na etapa anterior do experimento.
- c) avaliar a eficiência da biorremediação do bisfenol A em meio aquoso pela aplicação da lacase bruta de *Trametes* sp.
- d) avaliar o emprego da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa para a determinação do BFA em experimentos de biodegradação com a lacase bruta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo traz uma sucinta introdução ao extenso tema de contaminantes emergentes e compostos interferentes endócrinos, abordando seus principais aspectos como definições, origens, fontes e vias de contaminação, principais efeitos no organismo e no meio ambiente e as formas de tratamento.

O interferente endócrino bisfenol A (BFA) é tratado com maior detalhamento nesta revisão, abrangendo informações como a sua origem e aplicações industriais, os principais mecanismos de ação perturbadora nos organismos e no meio ambiente, as vias e os dados de contaminação humana e do meio ambiente, dados de produção e consumo, a legislação pertinente e as metodologias analíticas para a sua determinação.

Ainda na revisão bibliográfica, são trazidas informações sobre as lacases, abrangendo o seu mecanismo de ação, suas principais aplicações, bem como a sua obtenção por meio do cultivo de fungos da podridão branca.

As variáveis físico-químicas, os tipos de material lignocelulósico, os métodos de extração e caracterização de ligninas, e a aplicação de indutores químicos capazes de interferir na produção de lacases por estes fungos também são abordadas neste capítulo.

2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Segundo Patiño e colaboradores (2015), os contaminantes emergentes (CEs) podem ser definidos como poluentes não regulamentados que apresentam um risco significativo para o meio ambiente, deste modo requerendo uma regulamentação futura. Estes contaminantes podem ser oriundos de indústrias ou de metabólitos e outros produtos provenientes de reações no meio ambiente, além de subprodutos químicos gerados durante a produção e uso de produtos que contenham este tipo de poluente.

Nos últimos anos, o melhoramento das técnicas analíticas permitiu a determinação e a quantificação de compostos presentes em água em baixas concentrações, na ordem de microgramas ou nanogramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}), deste modo estas substâncias foram chamadas de micropoluentes ou CEs (SOARES; LEÃO, 2015).

Os CEs, mesmo em baixas concentrações, podem apresentar atividade biológica, além de serem persistentes e possuírem grande mobilidade no meio ambiente, tanto no ar como na água e no solo. O comportamento destas substâncias no meio ambiente e no corpo humano ainda não está completamente elucidado devido à falta de dados para determinar o seu risco e toxicidade (GAVRILESCU et al., 2015).

Muitos dos contaminantes emergentes encontrados em corpos hídricos são provenientes das indústrias que utilizam estes compostos como insumos na fabricação de cosméticos e perfumaria, retardantes de chama, nanopartículas, surfactantes e produtos de limpeza e higiene, como sabões, sabonetes e detergentes, além de herbicidas, fungicidas, fertilizantes, medicamentos de uso humano e veterinário, entre outros (HESPANHOL, 2015). Segundo Soares e Leão (2015) muitas dessas substâncias podem ainda ser classificadas como interferentes endócrinos, pois possuem ação desreguladora no sistema endócrino.

2.1.1 Interferentes endócrinos

Os contaminantes emergentes que causam perturbações no sistema endócrino, ou seja, que possuem ação estrogênica são chamados de “*endocrine disruptors*” na língua inglesa. Diversas traduções são possíveis para este termo, tal como: disruptores endócrinos, desreguladores endócrinos, perturbadores endócrinos, estrogênios ambientais e interferentes endócrinos, sendo este último o termo que será empregado ao longo deste trabalho.

Um interferente endócrino (IE) é uma substância química natural ou sintética, que mesmo em baixas concentrações, como ng L^{-1} , é capaz de alterar o funcionamento dos sistemas endócrino, imunológico e nervoso dos seres vivos, causando sérios danos ao sistema reprodutivo, distúrbios hormonais, alterações do sistema nervoso e até mesmo o câncer (ERKURT, 2015; GARCIA-MORALES et al., 2015; GHISELLI; JARDIM, 2007). E segundo os pesquisadores Lange, Kuch e Metzger (2013) a atividade estrogênica de diversas substâncias classificadas como IEs pode ser verificada *in vitro* por meio de ensaios *E-Screen* com o cultivo de células humanas.

Os IEs podem ser classificados em três tipos diferenciados: os estrogênios (esteróides de origem natural ou sintética), os xenoestrogênios (compostos sintetizados industrialmente) e os fitoestrogênios (substâncias presentes em plantas) (CHAVES, 2016; GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os estrogênios são hormônios reguladores sexuais de grande importância para o desenvolvimento das características sexuais e reprodutivas, em especial do sexo feminino. Tanto os de origem natural como sintética são classificados como estrógenos por possuírem composição química semelhante, como o estradiol, a estrona e o estriol (naturais), e o sintético mais presente em anticoncepcionais que é o 17- α -etilnilestradiol (SPOHR et al., 2014).

Já os xenoestrogênios são substâncias químicas com estrutura não esteróide e com ação semelhante aos estrogênios endógenos que podem interferir na liberação, produção, transporte, ligação, metabolismo ou eliminação dos hormônios naturais (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000). Alguns xenoestrogênios são bastante conhecidos, como as bifenilas policloradas (PCBs), alguns pesticidas, os aditivos plásticos (bisfenol A e ftalatos), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PHAs), os alquilfenóis (surfactantes), alguns compostos de organoestanho, e as dioxinas e furanos que são gerados como subprodutos na indústria (FONTENELE et al., 2010; GHISELLI; JARDIM, 2007). Diversos fármacos presentes em efluentes domésticos e em matrizes ambientais como solo e água também fazem parte deste grupo de contaminantes (GIMILIANI; FONTES; ABESSA, 2016).

Já os fitoestrogênios são compostos naturais que surtem um efeito antagonista ao se ligarem aos receptores de estrogênio no lugar do estradiol, deste modo reduzindo a interação deste hormônio com a sua célula-alvo (CARDOSO; VARANDA, 2014).

O mecanismo de funcionamento do sistema endócrino se dá pela interação dos receptores das células-alvo com os seus respectivos hormônios resultando em uma resposta imediata ao sistema, mantendo assim um equilíbrio na produção de hormônios pelas glândulas (SODRÉ et al., 2007). Os IEs agem substituindo as moléculas de hormônios ligando-se aos receptores das células-alvo em um processo de efeito agonista, ou seja, mimetizador. Também podem surtir um efeito antagonista, bloqueando a interação dos hormônios com as células-alvo (SODRÉ et al., 2007).

Estes contaminantes podem competir tanto com o hormônio feminino estradiol nos receptores de estrogênio, quanto com o hormônio masculino diidrotestosterona nos receptores de androgênio. Portanto, podem causar efeitos de feminilização ou masculinização sobre o sistema endócrino, sendo chamadas de substâncias estrogênicas aquelas que causam a feminilização, e de androgênicas as que causam a masculinização (GHISELLI; JARDIM, 2007).

No meio ambiente, os IEs podem estar mais disponíveis ou não, conforme algumas de suas propriedades e interações com o meio, tais como: bioacumulação, persistência, lipofilicidade, biotransformação, tempo de exposição, entre outros. Devido a sua alta capacidade de bioacumulação, estas substâncias podem chegar a elevadas concentrações em animais, sujeitando os que estão no topo da cadeia alimentar a maiores níveis de intoxicação (BILA; DEZOTTI, 2007).

Bila e Dezotti (2007) também apontam efeitos adversos na fauna causados pela exposição a estas substâncias, tais como a redução da eclosão de ovos de tartarugas, de pássaros e de peixes, problemas reprodutivos em diversas espécies, feminilização de peixes e distúrbios imunológicos em mamíferos marinhos, sendo que pode ainda ocorrer a transferência destas substâncias aos embriões e fetos através da placenta, ovos ou do aleitamento materno.

No Brasil, segundo Sodré (2012), as pesquisas sobre contaminantes interferentes endócrinos datam a partir de 1999, quando um grupo de pesquisadores alemães avaliou a ocorrência de estrogênios em uma estação de tratamento de esgotos (ETE) na cidade do Rio de Janeiro. Após este período, alguns poucos estudos foram realizados, e somente a partir de 2007, a preocupação com estes contaminantes emergentes ressurgiu, deixando bastante evidente a importância do esgoto, tratado ou não, como principal disseminador destes poluentes em águas naturais.

Em termos de contaminações por IE em águas superficiais, o Brasil apresenta o mesmo índice ou até três vezes o valor das concentrações relatadas na literatura (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

2.1.2 Remediação de interferentes endócrinos

A presença de IEs em cursos de água representa um sério risco à fauna e à saúde pública. Diante deste cenário, diversos experimentos têm sido realizados na

tentativa de remover ou mesmo reduzir a toxicidade destas substâncias no meio ambiente. Dentre as pesquisas recentes encontradas na literatura, pode-se destacar a degradação dos poluentes galaxolide (HHCB - fixador de perfume) e seus metabólitos de almíscares policíclicos (HHCB – lactona), o repelente N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) e os fármacos diclofenaco, carbamazepina e lidocaína por processos oxidativos UV e UV/H₂O₂ (SOARES, 2011); a avaliação do potencial do uso de processos oxidativos avançados (POAs) como o Fenton (GAMA, 2012); a degradação parcial de IEs através da cloração da água (PEREIRA et al., 2013); a utilização de técnicas de adsorção, fotodegradação, volatilização, lodos ativados, filtros biológicos percolados, reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) e lagoas de estabilização (AQUINO, BRANDT; CHERNICHARO, 2013) e a utilização da biotecnologia através da biorremediação, tais como a remoção de atrazina por fungo *Aspergillus niger* (BARBOSA et al., 2014), entre outros.

Alguns tratamentos complementares ou terciários aplicados na remoção de contaminantes emergentes presentes em água, como os processos de oxidação avançada (POAs), não eliminam por completo o contaminante e ainda podem gerar subprodutos potencialmente mais tóxicos do que o próprio poluente tratado. Deste modo, os métodos de biorremediação como a aplicação de enzimas, podem vir a ser viáveis, devendo portanto serem aprimorados e monitorados quanto aos seus produtos de degradação e a sua potencial toxicidade (CATHERINE; PENNINGCKX; FRÉDÉRIC, 2016; HOU et al., 2014).

A aplicação de enzimas no tratamento de contaminantes emergentes, normalmente, gera subprodutos sem ação estrogênica (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007), e em alguns casos, como o bisfenol A, a degradação pode gerar polímeros insolúveis de fácil remoção da água (LIN et al., 2016).

Os compostos aromáticos que possuem grupamentos hidroxilas e aminas podem ser degradados por enzimas oxidativas, como as lacases, tirosinases e peroxidases, o que demonstra o elevado potencial destas oxidases para a biorremediação de águas e solos contaminados com IEs, visto que em sua maioria estes são compostos fenólicos (KIM; NICELL, 2006a).

Segundo Alvarez e Illman (2006), a biorremediação pode ser definida como um processo espontâneo em que a catálise biológica age sobre determinados

poluentes, remediando parcialmente ou eliminando a contaminação presente em águas, efluentes, solos, entre outros.

A biorremediação pode ser realizada “*ex situ*”, quando o substrato contaminado é removido e tratado posteriormente, ou “*in situ*”, quando o processo de biorremediação ocorre diretamente no local contaminado (MARIANO, 2006). A biorremediação “*in situ*” é a técnica mais utilizada devido ao seu baixo custo, além de eliminar os custos com o transporte e o armazenamento de resíduos perigosos (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

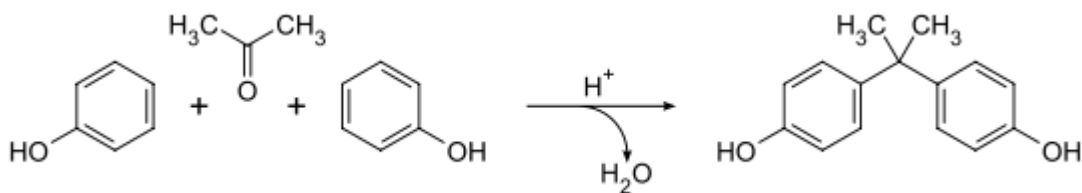
A biorremediação “*in situ*” pode ocorrer por meio de três processos diferenciados, são eles: a biorremediação natural ou intrínseca, na qual microrganismos nativos agem sem qualquer interferência tecnológica; a bioestimulação, na qual são inseridos no meio contaminado agentes estimulantes como oxigênio, nutrientes e biossurfactantes; e a bioaugmentação, que ocorre pela inoculação de consórcios de microrganismos enriquecidos (BENTO et al., 2003).

2.2 BISFENOL A

O bisfenol A (BFA: 4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano) é um monômero comumente utilizado na fabricação de resinas epóxi, que fazem parte do revestimento interno e externo de embalagens metálicas de produtos alimentícios, na produção de policarbonatos que são utilizados como plastificantes em mamadeiras, garrafas de água e outras embalagens e utensílios plásticos. Também é empregado como matéria-prima para a confecção de retardantes de chama, poliamida, poliuretano, policloreto de vinila (PVC), resinas ortodônticas, papéis térmicos e alguns produtos selantes (BERNARDO et al., 2015).

A síntese do BFA ocorre por meio de uma reação de condensação de acetona (que confere o sufixo A ao composto) com dois equivalentes de fenol em elevada temperatura, catalisada por um ácido como o ácido clorídrico (HCl) ou por uma resina de poliestireno sulfonada, conforme a reação representada na Figura 1. Em seguida, o BFA é purificado por meio de destilação, sendo então filtrado e seco (CARNEIRO, 2016; BESERRA et al., 2012).

FIGURA 01 - REAÇÃO DE SÍNTESE DE BISFENOL A



FONTE: (BESERRA et al., 2012).

Em 1891, o russo Alexander P. Dianin sintetizou pela primeira vez o BFA, mas somente em 1905 foi relatada em uma publicação a síntese de BFA, que foi realizada por Thomas Zincke da Universidade de Marburg, Alemanha, o qual identificou algumas propriedades deste composto, tais como: o ponto de fusão, a solubilidade e a composição molecular, porém a sua aplicabilidade ainda era desconhecida (FRANCK; STADELHOFFER, 1988). Em 1938, em um experimento realizado pela aplicação de 100 mg de BFA em ratos fêmeas das quais haviam sido removidos os ovários, foi identificada uma ação estrogênica que estaria intrinsecamente relacionada à presença de hidroxilas (-OH) na posição *para* dos anéis deste composto (DODDS et al., 1938). Simultaneamente em 1953, os químicos Daniel Fox da General Motors e Hermann Schnell da Bayer, descobriram a capacidade do BFA em formar ligações cruzadas na reação de polimerização do plástico policarbonatado (CARRAHER JR., 2016). A produção industrial do BFA para a fabricação de plásticos policarbonatados se deu em 1957 nos Estados Unidos e em 1958 na Europa, e somente mais tarde foi empregado na produção das resinas epóxi (CORRALES et al., 2015; HAMMAD et al., 2015).

2.2.1 Dados de produção e consumo de bisfenol A

O relatório divulgado pela empresa norte-americana *Grand View Research INC.* (2015) afirma que a produção de BFA em 2013 atingiu um valor em torno de 6,4 milhões de toneladas, sendo que deste total cerca de 5 milhões de toneladas foram utilizadas para a produção de plásticos policarbonatados e o restante para a fabricação de resinas epóxi. A projeção destes especialistas é de que até 2020 a produção mundial de BFA chegará a quase 10 milhões de toneladas ao ano.

Segundo pesquisa realizada em 2016 pela *Research and Markets*, o consumo mundial de BFA no ano de 2015 foi de aproximadamente 7,7 milhões de toneladas, com previsão de consumo de 8 milhões de toneladas em 2016. Até o ano de 2022, é esperada uma demanda de até 10,6 milhões de toneladas de BFA devido ao crescimento industrial dos mercados emergentes como a China, Índia, Rússia e México, e também pela sua utilização como insumo na produção de hélices de moinhos de energia eólica.

O crescimento industrial mundial tem acarretado um maior consumo de plásticos, que são substitutos mais econômicos quando comparados às embalagens de vidro e metal. Atualmente o consumo *per capita* de materiais plásticos na Europa Ocidental ou na América do Norte é de aproximadamente 100 quilos ao ano, enquanto que na Ásia esta média é de 20 quilos por pessoa (GOURMELON, 2015).

2.2.2 Dados de contaminação ambiental por bisfenol A

Diversos estudos têm sido realizados em corpos hídricos para avaliar a presença de contaminantes emergentes, em especial os interferentes endócrinos. Dentre estes, destaca-se o BFA devido ao seu elevado uso como insumo industrial na fabricação de polímeros.

Em análises realizadas em amostras do rio Paraíba do Sul, na cidade de Aparecida do Norte no estado de São Paulo, Chaves (2016) detectou a presença de BFA em 16,7% das amostras, nas quais as concentrações variaram de 0,032 a 0,088 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esteban e colaboradores (2014) avaliaram a presença e a atividade estrogênica de 30 interferentes endócrinos no rio Jarama na região de Madri na Espanha, onde o BFA foi detectado em 71% das amostras analisadas e a concentração máxima encontrada foi de 0,126 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em 37,5% das amostras coletadas do lago Paranoá, no Distrito Federal, foi detectada a presença de BFA em concentrações que variaram de 2,4 a 27,1 ng L^{-1} (SANTANA, 2013).

Amostras do rio das Velhas, em Ouro Preto e Nova Lima, no estado de Minas Gerais foram coletadas e analisadas durante oito meses a fim de se identificar e quantificar cinco IEs. Dentre os contaminantes endócrinos monitorados, o BFA foi detectado em concentrações de 0,0086 a 0,168 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MOREIRA et al., 2011).

Na Tabela 1, que apresenta os dados de contaminação por BFA em corpos hídricos relatados na literatura, é possível observar uma grande variação na concentração de BFA em diversas regiões do mundo entre os anos de 2007 e 2016.

TABELA 01- CONCENTRAÇÕES DE BISFENOL A EM CORPOS HÍDRICOS

Local	Concentração de BFA (ng L ⁻¹)	Referência
Alemanha	1.924	QUEDNOW; PU (2008)
Bélgica	580	VERLIEFDE et al. (2007)
Brasil	32 – 88	CHAVES (2016)
Brasil	2,4 – 27,1	SANTANA (2013)
Brasil	8,6 – 168	MOREIRA et al. (2011)
Brasil	204 -13.016	MONTAGNER; JARDIM (2011)
Canadá	87	KLEYWEGT et al. (2011)
China	2,2 – 1.030	ZHAO et al.(2009)
Espanha	126	ESTEBAN et al. (2014)
EUA	1.900	FOCAZIO et al. (2008)
França	136 -156	BAUGROS; GIROUD; DESSALCES (2008)
Holanda	22.000	VERLIEFDE et al. (2007)
Itália	68	LOOS; LOCORO; CONTINI (2010)
Portugal	106 – 880	RIBEIRO; PARDAL (2008)
Suíça	2 – 46	JONKERS et al. (2009)

FONTE: Modificado de Simões, (2016).

O BFA também pode estar presente no ar como um contaminante atmosférico. Li e Wang (2015) avaliaram a presença de BFA e ftalatos no ar de regiões urbanas da China, e encontraram valores para BFA na ordem de 1,0-20 ng m⁻³, o que representa até duas vezes a concentração relatada na literatura específica. Também constataram que a principal fonte de BFA na atmosfera é derivada da queima não controlada de resíduos sólidos.

Os pesquisadores Fu e Kawamura (2010) encontraram concentrações de 170 a 880 pg m⁻³ de BFA nas regiões centrais da Ásia, Nova Zelândia e EUA. Nas cidades de Chenay e Bombay, regiões urbanas da Índia foram detectadas concentrações mais elevadas, na ordem de 4,55 ng m⁻³, que são derivadas da intensa combustão não controlada de produtos plásticos de uso doméstico. A Antártica está contaminada por BFA em concentrações de 1 a 17 pg m⁻³, sendo que houve um incremento deste contaminante nesta região entre os anos 1991 a 2000, que pode ser devido ao carreamento destes poluentes dos continentes do sul, sendo transportados por meio da circulação meridional troposférica e também originados por fontes locais de emissão nesta região.

2.2.3 Vias de contaminação ambiental por bisfenol A

As principais fontes de contaminação no meio ambiente por BFA são a sua produção industrial, o tratamento e processamento para a obtenção de polímeros, a degradação de resinas epóxi e policarbonatos que liberam os monômeros do BFA para o ambiente, bem como a lixiviação de embalagens em aterros sanitários (GASSARA et al., 2013; MERCEA, 2009).

Os contaminantes emergentes, como o BFA, após atingirem os corpos hídricos podem sofrer processos de degradação dependendo de suas características físico-químicas. Fatores ambientais como temperatura, oxigenação e incidência de luz solar também podem influenciar na degradação destes compostos na água. Contudo, diversos contaminantes são recalcitrantes no meio ambiente, e se depositam no sedimento ou no meio aquático (SUMPTER, 2010).

2.2.4 Vias de exposição humana ao bisfenol A

A exposição e a contaminação humana pelos compostos interferentes endócrinos, como o BFA, podem ocorrer por meio de diversas fontes, porém para Bernardo e colaboradores (2015) a principal via ainda são os alimentos, visto que uma grande porcentagem da população, com diferentes faixas etárias, tem acesso a determinados tipos de produtos ocasionando uma exposição prolongada em doses extremamente baixas de BFA, o que muitas vezes dificulta a sua detecção no organismo.

O BFA pode ser liberado das embalagens para os produtos alimentícios devido à sua despolimerização induzida por elevadas temperaturas aplicadas para fins de pasteurização como em latas de conserva (4 a 23 μg lata⁻¹ e 7 a 380 μg kg⁻¹ de alimento), bebidas como sucos e refrigerantes (7 a 58 μg mL⁻¹), ou até mesmo pelo aquecimento involuntário dos alimentos armazenados ou transportados inadequadamente como no caso das embalagens plásticas (7 a 58 μg g⁻¹ de alimento). Também pode ocorrer a polimerização incompleta do BFA durante a fabricação de resinas e policarbonatos facilitando a sua migração para os alimentos embalados por estes polímeros (MARKEY et al., 2003).

Outra fonte de contaminação de BFA e outros IEs é a água tratada, visto que os processos convencionais de tratamento de esgoto e água são específicos para a

remoção de material em suspensão e coloidal, patógenos e algas, não sendo eficientes na remoção de contaminantes emergentes nesta matriz ambiental (GONÇALVES, 2012; SIMÕES, 2016). Os seres humanos estão expostos a contaminações por BFA através do sistema digestivo, pela inalação de poeiras contendo partículas deste IE e por contato direto com a pele (MICHAŁOWICZ, 2014).

2.2.5 Dados de contaminação humana por bisfenol A

Mendonça e pesquisadores (2014) avaliaram as concentrações de BFA no leite materno de 27 mulheres e na urina de seus 31 bebês com idade entre 3 a 15 meses. Em 93% das amostras de urina foi detectada a presença de BFA em concentrações de 1,2 a 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e no leite materno o BFA foi encontrado em 75% das amostras em concentrações de 0,4 a 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto, não há correlação entre a concentração de BFA na urina com a fonte de nutrição (leite materno ou fórmula industrializada) ou ainda com o sexo do bebê.

Em estudo realizado com 287 voluntários chineses com idade entre 3 a 24 anos foi detectada a presença de BFA, 4-nonilfenol e triclosan na urina, sendo que o BFA apresentou uma concentração média de 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$. O grupo do sexo feminino apresentou maiores taxas de concentração dos contaminantes pesquisados. Os indivíduos que utilizavam copos plásticos apresentaram maiores concentrações de BFA do que os que utilizavam copos de vidro ou de cerâmica (LI et al., 2013).

Os pesquisadores Zhang, Sun e Kannan (2013) realizaram um estudo na China para determinar a concentração de BFA no sangue de 80 indivíduos, sendo distribuídos em grupos de crianças de 1 a 5 anos (10), mulheres (sendo 30 grávidas e 10 não grávidas), e fetos por meio do cordão umbilical (30). Para avaliar a relação entre as concentrações de BFA na urina e no sangue, foram coletados espécimes pareados de sangue e urina (n = 50 pares). O BFA foi detectado em 46% das amostras de sangue analisadas, com uma média de 0,19 ng mL^{-1} , e foi detectado em 84% das amostras de urina, com uma concentração média de 1,01 ng mL^{-1} .

No Brasil um estudo denominado “Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução (CUIDAR)”, que objetivou avaliar a exposição de gestantes a substâncias consideradas como interferentes endócrinos, a pesquisadora

Souza (2016) investigou a presença de 9 parabenos, 7 fenóis e 24 metabólitos de ftalatos na urina de 50 gestantes recrutadas por meio do programa de saúde materno-infantil da cidade de Curitiba (Mãe Curitibana). O BFA foi detectado em 98% das amostras de urina em uma concentração média de $3,62 \mu\text{g L}^{-1}$, valores estes maiores do que os relatados em estudos realizados em países como a Dinamarca ($1,52 \mu\text{g L}^{-1}$), EUA ($1,3 \mu\text{g L}^{-1}$), Porto Rico ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$), Canadá ($1,2 \mu\text{g L}^{-1}$), Espanha ($2,2 \mu\text{g L}^{-1}$) e Grécia ($1,2 \mu\text{g L}^{-1}$).

2.2.6 Função desreguladora do bisfenol A nos organismos

O BFA interfere diretamente no sistema endócrino, causando alterações na síntese, liberação, transporte, ligação e eliminação de hormônios naturais, desregulando o metabolismo e causando perturbações no desenvolvimento físico de seres humanos e de animais (BERNARDO et al., 2015).

A forma de atuação do BFA nos organismos se dá pela interação que estabelece com o estrogênio, androgênio, aril-hidrocarboneto e outros receptores que são ativados pela peroxissoma, de modo que podem ocorrer perturbações endócrinas envolvendo os hormônios sexuais, a insulina, a leptina, a adiponectina e a tiroxina, além de alterações nos sistemas nervoso e imunológico. O BFA pode apresentar reações multidirecionais nos organismos devido à sua interação com os receptores, gerando radicais livres e alterando a sinalização celular, o que pode inibir a metilação do DNA e provocar alterações mutagênicas (MICHAŁOWICZ, 2014).

Veiga-Lopez e colaboradores (2013) relacionaram a exposição ao BFA a patologias em seres humanos, como a síndrome metabólica. Os autores verificaram que a exposição de fetos ao BFA induz a resistência à insulina, o que está relacionado com alterações na adiponectina e marcadores inflamatórios do tecido adiposo.

A ação estrogênica, a hepatotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade do BFA foram demonstradas em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, porém, não há correlação exata da concentração de BFA necessária no organismo humano para que tais efeitos ocorram. A exposição continuada a este composto pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas, como o diabetes e a obesidade, além de elevar as chances de ocorrência de

doenças cardíacas (MICHAŁOWICZ, 2014). O BFA também pode estar relacionado ao desenvolvimento de algumas doenças autoimunes e outras doenças complexas do sistema imunológico (KHARRAZIAN; VOJDANI, 2016).

A correlação do BFA com anticorpos neurológicos foi avaliada por meio da determinação de anticorpos em 100 indivíduos saudáveis por Kharrazian e Vojdani (2016), que identificaram uma estreita relação deste contaminante com a produção de anticorpos e concluíram que o BFA pode ser um fator para o desenvolvimento de doenças autoimunes e outros distúrbios neurológicos.

Prins e colaboradores (2014) avaliaram o potencial carcinogênico do BFA para a próstata humana por meio do cultivo de células-tronco de indivíduos jovens e saudáveis com exposição a baixas concentrações de BFA, e concluíram que este contaminante tem o potencial de aumentar e modificar as células da próstata alterando o seu mecanismo normal de crescimento, podendo assim causar câncer.

A exposição de fetos e crianças ao BFA está associada à hiperatividade e ansiedade, além de outros problemas comportamentais, segundo o estudo de Harley e colaboradores (2013) que foi realizado com 300 gestantes, onde a presença de BFA na urina das grávidas foi relacionada com o comportamento de seus filhos aos 5, 7 e 9 anos de idade por meio de relatos dos pais e professores, e comparativos das análises de urina das crianças.

O BFA pode alterar o sistema endócrino feminino tanto por efeitos agonistas e antagonistas, como por fatores de transcrição e modificação na expressão de enzimas responsáveis pela síntese ou catabolismo de esteróides. Dentre as disfunções ocasionadas ao sistema reprodutivo feminino está a síndrome dos ovários policísticos, a puberdade precoce e a falência ovariana prematura (COSTA et al., 2014).

2.2.7 Métodos analíticos para determinação de bisfenol A

Segundo Salgueiro-González e colaboradores (2012) diferentes técnicas de cromatografia podem ser empregadas para análises quantitativas do BFA. A cromatografia gasosa (CG) pode ser utilizada, porém devido à polaridade e baixa volatilidade deste composto, se faz necessária a derivatização da amostra. Por este motivo, a cromatografia líquida tem sido a técnica mais empregada para a determinação deste contaminante. Os detectores mais comumente utilizados são os

de UV-Vis e de fluorescência, embora não possuam a especificidade do detector de massa, que é mais robusto para este tipo de análise devido à sua maior sensibilidade e seletividade (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2012).

Na literatura são reportadas algumas técnicas analíticas para a determinação do BFA, tais como: espectrofotometria UV-Vis (HAMMAD et al., 2015), extração em fase sólida com posterior derivatização com anidrido trifluoroacético e a análise por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (MATTA et al., 2012), cromatografia líquida de ultra performance, com detector de arranjo de diodos (LIBARDI JR., 2010), cromatografia líquida com detector UV-Vis (CHAVES, 2016), cromatografia líquida com detector de massa (GONÇALVES, 2012; QUEIROZ, 2011), cromatografia gasosa com detector de massa (AZEVEDO et al., 2001), cromatografia líquida com detector de fluorescência (CARNEIRO, 2016), entre outros.

2.2.7.1 Espectrofotometria derivativa UV-Vis

Segundo Baldissera e colaboradores (2016) a espectrofotometria na região ultravioleta é uma técnica robusta, de baixo custo e que produz resultados confiáveis em curto espaço de tempo. Porém, podem ocorrer sobreposições de picos em soluções multicomponentes, o que exige um tratamento prévio das amostras ou a derivação matemática dos espectros.

A espectrofotometria derivativa é uma técnica de ajuste analítico que tem sido empregada na indústria farmacêutica como ferramenta no controle da qualidade de medicamentos, pois além de aumentar a seletividade e a sensibilidade nas análises contendo misturas, é um procedimento simples, rápido e que não necessita de extração prévia do analito. Na derivação dos espectros ocorre a separação dos sinais sobrepostos, além de se eliminar o sinal de fundo causado pelos demais compostos presentes na amostra (DIL et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016).

Segundo Paschoal e colaboradores (2003), a derivação do espectro de ordem zero não altera as informações originais, apenas gera uma supressão das bandas largas, destaca as bandas estreitas e melhora a resolução dos “ombros” para as bandas, obedecendo a Lei de Lambert-Beer. A derivação dos espectros é normalmente obtida por uma função no próprio *software* utilizado em conjunto com o espectrofotômetro.

Na primeira derivada, obtida pela técnica do ponto de anulação (*zero crossing*), ocorre a anulação no ponto máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) do espectro de ordem zero, sendo positivo para o aumento de absorção e negativo para o decréscimo. Deste modo, a curva diferencial de ordem n irá se anular n vezes, com número de bandas igual a $n + 1$ (PASCHOAL et al., 2003).

A espectrofotometria derivativa pode ser empregada na determinação simultânea de compostos orgânicos e inorgânicos, em análises de sistemas com dois ou mais componentes, na remoção da turbidez da amostra e na eliminação ou redução dos efeitos causados por alterações e inclinações na linha de base. Este método apresenta uma resposta muito rápida, em apenas poucos minutos, em comparação com outros métodos cromatográficos, além de não necessitar de pré-extrações na amostra, ser de fácil aplicação, e não empregar o uso de reagentes e equipamentos de elevado custo (OJEDA; ROJAS, 2013).

2.3 LEGISLAÇÃO DE CONTAMINANTES EMERGENTES

Diversos países têm desenvolvido métodos de análise para identificar o potencial estrogênico de algumas substâncias, dentre estes está o programa da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), chamado de *Endocrine Disruptor Screening Program* (EDSP) e o *Joint Working Group on Endocrine Disruptors Testing and Assessment* (EDTA), patrocinado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). No Japão diversos contaminantes emergentes (CEs) estão sendo avaliados por meio do *Endocrine Disruptor Screening Program* (EDSP) desenvolvido pela Agência Ambiental do Japão (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

No Canadá, as pesquisas institucionais e acadêmicas estão direcionadas à normalização da identificação dos IEs, sendo que em 2010 foi apresentada uma proposta para se regulamentar as ETEs, na qual foi sugerido o emprego de tratamentos secundários eficientes na remoção ou redução de contaminantes emergentes. Na Europa foi implementada a "*Community Strategy for Endocrine Disruptors*", que visa unificar as informações científicas sobre os CEs suspeitos de serem interferentes endócrinos, sendo que dos 575 compostos estudados, 320 apresentaram ação desreguladora do sistema endócrino. A Agência Europeia dos Produtos Químicos começou, no ano de 2011, a controlar os produtos que contêm

substâncias passíveis de causar danos ao sistema endócrino (HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Os padrões de potabilidade e qualidade da água para o consumo humano no Brasil seguem os procedimentos estabelecidos na Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde de 12 de dezembro de 2011, que visa apenas o monitoramento químico e biológico, não abrangendo o controle de contaminantes emergentes presentes nesta matriz ambiental (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; PEREIRA et al., 2014). Segundo estas diretrizes, uma amostra de água que esteja contaminada por CEs, mas que atenda aos requisitos desta norma, é considerada potável (SOARES; LEÃO, 2015).

O despejo de esgoto, mesmo que tratado convencionalmente, traz sérios riscos de contaminações por CEs em corpos receptores, visto que as ETEs são providas apenas de processos de tratamento simples, que em geral são ineficazes para a remoção destes compostos. Portanto, é de extrema importância que haja uma readequação na legislação ambiental a fim de garantir uma maior segurança à saúde e ao meio ambiente (CALHEIROS; AMORIM; CASTRO, 2014; SILVA et al., 2016).

2.3.1 Legislações e padrões referentes ao bisfenol A

A maior parte das legislações que tratam de padrões referentes ao BFA não se enquadra em contaminações de matrizes ambientais, como água, solo e ar. Na legislação brasileira não estão contemplados os padrões para o BFA em água, existindo apenas um valor definido para os derivados fenólicos, o qual está estipulado em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ como a concentração máxima em água (PEREIRA et al., 2014).

Diversos países proibiram a produção de garrafas e embalagens que contenham BFA, principalmente para lactantes e crianças, devido à sua migração para os alimentos e bebidas. Este composto deve ser substituído por bisfenol S (BFS) ou outros compostos semelhantes, porém, estes também não possuem estudos que comprovem a sua segurança à saúde e ao meio ambiente (MICHAŁOWICZ, 2014).

Em 2006, a *European Food Safety Authority* estipulou o limite de migração específica (LME) de BFA em $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ por peso corporal por dia. No Canadá, em 2008, foi proibido o uso de BFA na fabricação de mamadeiras, e em 2010, países

como a Dinamarca e França também proibiram a fabricação e importação de mamadeiras e outras embalagens de alimentos para crianças de 0 a 3 anos que contenham BFA em sua composição (BERNARDO et al., 2015).

Em 2011, a Comissão Europeia, por meio do Regulamento nº 10/2011 autorizou o uso de bisfenol A em embalagens plásticas para alimentos com um LME de BFA de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento, e por meio da Diretiva nº 8/2011 proibiu o uso de policarbonato para a produção de mamadeiras. No Brasil, a ANVISA, por meio da Resolução RDC nº 17/2008, que corresponde à Resolução GMC do MERCOSUL nº 32/2007, estabeleceu um LME de BFA de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento, e por meio da Resolução RDC nº 41/2011 proibiu a produção e importação de mamadeiras que possuam BFA em sua composição. No ano seguinte, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 56/2012, que corresponde à Resolução GMC do MERCOSUL nº 02/2012, a qual manteve o LME de BFA em $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento, e não autorizou o uso do BFA na fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados a alimentação de lactantes (BERNARDO et al., 2015).

2.4 LACASES

O primeiro registro científico sobre a lacase data de 1883 e foi realizado por Yoshida, que ao estudar a seiva da árvore da laca japonesa *Rhus vernicifera* acabou por descobrir esta enzima (YOSHIDA, 1883).

Em 1894, o bioquímico francês Gabriel Bertrand descreveu o mecanismo de ação da enzima em seu artigo “*Sur le látex de l'arbre à laque*” onde relata ter isolado e purificado a lacase (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

As lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoredutase - EC1.10.3.2) são multicobredoxidasas (MCOs) capazes de catalisar a reação de oxidação de diversos substratos aromáticos, reduzindo o oxigênio molecular à água (ALMEIDA et al., 2012; GE et al., 2010; GIARDINA et al., 2010; JONES; SOLOMON, 2016).

Diferentemente das peroxidases, que são dependentes de oxigênio e necessitam da adição de peróxido de hidrogênio, as lacases não precisam da adição de cofatores de baixa massa molar, pois utilizam o oxigênio molecular disponível no ambiente (ARORA; SHARMA, 2010; TORRES-DUARTE; VIANA; VAZQUEZ-DUHALT, 2012).

As MCOs estão subdivididas em dois grupos, sendo o primeiro composto por enzimas com elevado grau de especificidade como as ceruloplasminas (ferroxidasas) que são responsáveis pela oxidação de ferro em mamíferos, e o segundo grupo é formado por enzimas de baixa especificidade, como a ascorbato peroxidase e a lacase, que são capazes de oxidar diversos compostos orgânicos participando do processo de síntese da lignina ou da sua degradação (JONES; SOLOMON, 2016).

As lacases podem catalisar substratos orgânicos e inorgânicos, como mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxi-fenóis e aminas aromáticas pela transferência de elétrons (DAI et al., 2016; PACHECO; SOARES, 2014; PRASETYO et al., 2016; SHI et al., 2014). Em conjunto com compostos de baixo peso molecular, chamados de mediadores, estas enzimas também são capazes de oxidar substratos aromáticos não-fenólicos (D'ALFONSO et al., 2014; IVANEC-GORANINA et al., 2015; SPINELLI et al., 2013).

Estas polifenoloxidasas, normalmente, possuem quatro átomos de cobre distribuídos entre diferentes sítios de ligação, que são classificados como: tipo T1, cobre mononuclear que atua como receptor primário de elétrons, e o cobre triatômico redutor T2 e T3, distinguindo-se por suas propriedades específicas e modo de ação no mecanismo de catálise enzimática (CHEN et al., 2015b; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; LIU et al., 2014; VASINA et al., 2015).

As lacases oxidam compostos fenólicos a radicais ariloxila, que sofrem reações espontâneas por condensação oxidativa e acoplamento fenólico ou oxidativo, dando origem a compostos solúveis ou insolúveis em água, sendo que estes últimos podem ser removidos por processos físicos como precipitação, filtração ou centrifugação (ALVES, 2010; CATHERINE; PENNINCKX; FRÉDÉRIC, 2016).

Estas oxidases participam nos processos de biossíntese e degradação de lignina, morfogênese e biossíntese de pigmentos, entre diversos outros. Atuam na catálise de compostos aromáticos e não aromáticos, e são resultantes do metabolismo de insetos, plantas, bactérias e fungos (CAVALLAZZI; OLIVEIRA; KASUYA, 2004; RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Dentre as mais de 200 formas conhecidas de enzimas oxigenases e oxidases, somente lacases, citocromo C oxidase, bilirrubina oxidase,

ceruloplasmina, L-ascorbato oxidase e fenoxazinona sintase possuem a capacidade de catalisar este tipo de reação de redução de oxigênio (GIARDINA et al., 2010).

Nos processos oxidativos de compostos orgânicos realizados pela enzima lacase podem ser observadas ações de dupla funcionalidade, ou seja, tanto catabólicas como anabólicas que possuem um papel importante na degradação de lignina. Nas vias catabólicas os compostos orgânicos agem como mediadores da enzima facilitando o ciclo redox, deste modo podem ser utilizados na remediação de contaminantes recalcitrantes ou em processos industriais, como o branqueamento de fibras. Nas vias anabólicas ocorre um acoplamento oxidativo das frações orgânicas que dão origem a polímeros e compostos de adição. Estas ações bifuncionais das lacases e algumas substâncias orgânicas conferem a esta enzima oxidase uma grande versatilidade em seu uso (JEON; CHANG, 2013).

A lacase é capaz de atuar em uma vasta gama de substratos, incluindo alguns compostos químicos, o que lhe confere um grande potencial para o uso em escala industrial no campo da biotecnologia. Diversos efluentes com elevado poder nutricional, como os da indústria alimentícia, são descartados incorretamente no meio ambiente sendo que poderiam ser aproveitados como substrato para a produção de lacase e outras enzimas lignocelulolíticas por microrganismos, em especial alguns fungos (MELO et al., 2015).

As lacases fúngicas são proteínas glicosiladas e seu potencial redox lhes confere a capacidade de catalisar uma gama maior de compostos em relação a outros tipos de lacases (ADEKUNLE; GUO; LIU, 2017; FERRARIO et al., 2015). Estes catalisadores específicos e eficientes são capazes de degradar diversos compostos tóxicos por meio de processos oxidativos (DESAI; NITYANAND, 2011). A lacase foi empregada pela primeira vez na indústria na década de 90, desde então inúmeros estudos sobre esta enzima têm sido realizados (CHEN et al., 2016).

Esta enzima pode ser utilizada em diversas aplicações industriais, tais como deslignificação e branqueamento de polpa celulósica, melhor digestibilidade de materiais lignocelulósicos utilizados para a produção de ração animal, de vinhos e sucos, fermentação de cafés e chás, aplicação em testes de diagnósticos clínicos, tratamento de efluentes industriais, biorremediação de solos, descoloração de corantes têxteis, produção de biosensores para a detecção de substâncias fenólicas, síntese de alguns fármacos, deslignificação de materiais lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração por aumentar a

hidrólise com a remoção dos compostos fenólicos e da lignina que são naturalmente inativadores de celulasas. Na sua fase livre as lacases podem ser aplicadas em reatores para o branqueamento de polpa de celulose, remoção de corantes, destoxificação de efluentes e biorremediação (ALMEIDA, 2015; ANDRADE, 2011; BETTIN et al., 2011; FRAZÃO et al., 2014; NETO, 2010; PATEL et al., 2014).

Segundo Li e colaboradores (2016) as lacases podem ser consideradas biocatalisadores “verdes” devido à sua elevada capacidade oxidativa com a geração de subprodutos, normalmente, não-nocivos quando aplicadas ao tratamento de corantes têxteis e outros contaminantes em água, bem como o seu uso no branqueamento de papel e celulose, sucos e vinhos, entre outras aplicações industriais.

2.4.1 Indutores para a síntese de lacases

Dentre os basidiomicetos, estão os fungos da podridão branca que são excelentes produtores de lacase e podem ser cultivados em substratos lignocelulósicos de baixo valor comercial. No entanto, a produção destas isoenzimas em substratos lignocelulósicos simples não atinge concentrações desejáveis para a aplicação em escala industrial, assim a escalabilidade pode ser atingida com a otimização da produção pela aplicação de indutores enzimáticos, como cobre, ligninas, alguns compostos aromáticos ou fenólicos, etanol, entre outras substâncias que são capazes de afetar principalmente a transcrição de genes que codificam as lacases (CASTAÑO; CRUZ; TORRES, 2015; TINOCO et al., 2011; VALLE et al., 2015; VALLE, 2012; ZHU; BAO; HUANG, 2016).

Outro fator a ser considerado é a composição nutricional do meio de cultivo, visto que a produção de lacase é influenciada pela relação entre carbono e nitrogênio disponíveis no mesmo. A sinergia proveniente da combinação destes fatores no substrato pode surtir um efeito extremamente positivo, e levar a uma elevada produção de lacase em curtos períodos de tempo (TINOCO et al., 2011).

Um indutor enzimático pode ser o próprio substrato da enzima ou um composto análogo, como 2,5-xilidina, álcool veratrílico, guaiacol e outros compostos aromáticos. Compostos naturais complexos, como a lignina e compostos derivados de lignina, também podem ser utilizados como indutores na síntese de lacases fúngicas (TAVARES, 2006).

Diferentes compostos têm sido largamente utilizados para estimular a produção de lacase, como o ácido gálico, o sulfato de cobre, o etanol, o cloreto de amônio, o ácido ferrúlico, o guaiacol, a xilidina, a seringaldazina, o álcool veratrílico, entre outros. Também é comum a adição de emulsificantes, como por exemplo o *Tween 80* ao meio, para que ocorra uma melhor homogeneização e um aumento na quantidade de oxigênio dissolvido no meio líquido, facilitando a oxidação (ZAMPIERI, 2006).

Segundo Fonseca e coautores (2016) diversos fatores influenciam a produção de enzimas pelos basidiomicetos, sendo que um dos principais é a presença de íons metálicos no meio de cultivo. A temperatura e o pH são importantes tanto na atividade como na estabilidade destas enzimas.

A presença de íons metálicos em baixas concentrações, como Cu_2^+ , Cd_2^+ , Ni_2^+ , Mo_3^+ e Mn_2^+ pode influenciar positivamente a produção de enzimas pelos fungos da podridão branca. Enquanto que pequenas concentrações dos íons Ag_2^+ , Hg_2^+ , Pb_2^+ , Zn_2^+ podem causar inibição da síntese enzimática (ASGHER; NASIR IQBAL; ASAD, 2012).

2.4.1.1 Dioxano

O dioxano é um éster cíclico saturado, biorefratário, miscível em água, classificado como produto perigoso, e que possui potencial cancerígeno aos seres humanos conforme a classificação da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (NAKAGAWA; TAKAGI; MAEKAWA, 2016; SHARMA; KAUR, 2017).

O solvente 1,4-dioxano é amplamente utilizado em processos industriais na fabricação de corantes, artigos têxteis, adesivos, lacas, vernizes, desengraxantes, cosméticos, detergentes não iônicos etoxilados, óleos, tintas, moléculas orgânicas, pesticidas, plásticos, entre outros (CARRERA et al., 2017; SHARMA; KAUR, 2017).

O dioxano é um solvente apolar aprótico podendo ser utilizado em reações de polimerização, na limpeza de materiais eletrônicos e superfícies poliméricas (NAIN et al., 2017).

2.4.1.2 Siringol

O siringol (2,6-dimetoxifenol) e seus derivados, bem como o guaiacol são metoxifenóis produzidos pela pirólise da lignina de madeira (HINDI, 2011; LAURAGUAIS et al., 2012).

O metoxifenol e seus derivados alquilados constituem a principal fração fenólica da fumaça da madeira, sendo o responsável pelo aroma dos produtos defumados a partir da queima de madeiras (BÖLICHE; TERNES, 2016).

As lacases possuem afinidade com uma vasta gama de substratos, porém é sabido que os metoxifenóis siringol e guaiacol são melhor oxidados por esta enzima do que outros substratos como o catecol e a hidroquinona (ARORA; SHARMA, 2010).

Este composto é usualmente empregado como substrato na análise da atividade enzimática da lacase, ou ainda como mediador desta enzima (BARRASA et al., 2014; PISTONE et al., 2016; SINGH et al., 2017).

2.4.1.3 Sulfato de cobre

O sulfato de cobre II (CuSO_4) é normalmente utilizado como pesticida, herbicida e fungicida, e também em tinturas para cabelo, coloração de vidros, tratamento de água de piscinas, processamento de couro, produtos têxteis, fabricação de fogos de artifício, entre outros.

Este sal também tem sido utilizado no tratamento de deficiência de cobre em seres humanos, e como inibidor do afloramento de algas em água (GOMAA; NEGM; TAHOON, 2016).

O cobre é um dos componentes de formação da lacase, portanto a sua adição ao meio de cultivo induz a síntese desta enzima por diversos fungos. Outra função do cobre é a inibição de uma protease extracelular responsável pela degradação da lacase (BİRHANLI; YEŞİLADA, 2017).

2.5 BASIDIOMICETOS

Os fungos possuem duas formas morfológicas distintas: as leveduras, que são unicelulares e possuem corpos esféricos, e os bolores (hifas) que são multicelulares e possuem diversas formas estruturais com funções específicas conforme os gêneros. Alguns fungos são dimórficos, ou seja, são capazes de se desenvolverem de ambas as formas (levedura ou bolor), o que depende de fatores ambientais e nutritivos. As hifas são filamentos tubulares que armazenam o citoplasma e suas organelas, e são as unidades estruturais dos bolores. Os septos são unidades celulares transversais das hifas, e apresentam poros permeáveis que permitem o transporte celular do citoplasma e organelas. O conjunto de hifas que formam a colônia ou biomassa do fungo é chamado de micélio (SAMARANAYAKA, 2012).

Os fungos não realizam fotossíntese, são organismos aeróbicos e se desenvolvem melhor em meios ácidos, além de possuírem tolerância a elevadas concentrações de íons metálicos (MANAHAN, 2013).

Os fungos são divididos em três classes: basidiomicetos, ficomicetos e ascomicetos. Os basidiomicetos subdividem-se em dois grupos: os gasteromicetos, e os himenomicetos que são degradadores da madeira. O micélio desta classe é formado por hifas septadas, e pode ter um crescimento indefinido ou formar corpos de frutificação. A reprodução ocorre por meio do basídio, que é uma hifa ramificada, uni ou pluricelular, que possui um basidiósporo em cada extremidade das ramificações (AZEVEDO, 1999).

As estruturas de reprodução dos basidiomicetos, mais comumente encontrados na natureza, são macroscópicas e vulgarmente conhecidas como cogumelos e orelhas de pau. A maioria dos basidiomicetos utiliza a madeira como substrato para crescimento e estão subdivididos em grupos, dos quais os dois de maior interesse biotecnológico são: o grupo da podridão branca (fungos lignocelulolíticos), capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina em CO₂ e água, transformando a madeira em um material esbranquiçado, laminado, esponjoso e fibroso, e o segundo grupo, o da podridão parda, capazes de degradar celulose e hemicelulose, transformando a madeira em um material escuro e amorfo (MURRAY; ROSENTHA; PFALLER, 2014; SADAVA et al., 2009).

A parede celular de materiais lignocelulósicos apresenta baixa porosidade não permitindo a entrada de moléculas como as proteínas que possuem massa molar elevada, sendo este, um fator contrário ao processo biodegradativo. De modo que alguns microrganismos desenvolveram metabolismos mais complexos capazes de desestruturar a parede celular por meio da despolimerização dos seus componentes, formando unidades passíveis de serem metabolizadas (AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Os basidiomicetos produzem algumas enzimas que estão relacionadas à degradação de diversos materiais lignocelulósicos, como as fenoloxidasas (metalproteínas), que são subdivididas em dois grupos: as dependentes de peróxidos, lignina peroxidase (LiP EC 1.11.1.14) que pode abstrair elétrons de compostos aromáticos não fenólicos gerando radicais positivos, e a manganês peroxidase (MnPEC1.11.1.13) que é dependente de Mn^{2+} e tem capacidade de abstrair elétrons de fenóis, e ainda as cuproproteínas lacases (Lac EC1.10.3.2) que não são dependentes de peróxidos e agem pela abstração de um elétron de composto fenólico devido à redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} , reduzindo O_2 a H_2O em uma reação cíclica (AGUIAR; FERRAZ, 2011; D'AGOSTINI et al., 2011).

A produção enzimática por basidiomicetos possui tempo e custo reduzido, visto que as enzimas produzidas podem ser extraídas diretamente do micélio, não havendo necessidade do desenvolvimento do corpo de frutificação (MANTOVANI et al., 2012).

A produção de biomassa e exopolissacarídeos durante o cultivo não são dependentes entre si, e estão relacionadas aos parâmetros de cultivo, como: pH, temperatura, oxigenação, relação das fontes de carbono e nitrogênio, agitação, entre outros. Estes fatores são capazes de interferir, positivamente ou negativamente, na produção da massa micelial ou das substâncias sintetizadas pelos basidiomicetos (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005).

Diversos resíduos agrícolas, como a fibra de coco, o bagaço de cana-de-açúcar e os restos de cultivo de banana, que possuem elevado teor de ligninas são desperdiçados em queimadas que geram poluição atmosférica. Os fungos da podridão branca podem ser empregados para a valorização destes resíduos por meio da sua biodegradação e síntese de enzimas lignocelulolíticas (THIRIBHUVANAMALA et al., 2017). Outros resíduos agrícolas, como casca e polpa

de café, bagaço de mandioca e polpa de beterraba também podem ser empregados como substrato para o cultivo destes fungos (SOARES et al., 2000).

2.5.1 *Trametes* sp.

O gênero *Trametes* faz parte do filo basidiomycota e é um dos fungos da podridão branca mais estudados, devido ao seu potencial biotecnológico na produção de enzimas ligninocelulolíticas. Este fungo sintetiza durante o seu desenvolvimento algumas enzimas, como a lacase, a manganês peroxidase e, raramente, a lignina peroxidase. Dentre as aplicações biotecnológicas deste basidiomiceto está o tratamento de efluentes industriais, como de: papel e celulose, alimentos, química, têxtil, biocombustíveis, farmacêutica e cosmética, dentre outras (DAASSI et al., 2013; NYANHONGO et al., 2007; SI; PENG; CUI, 2013).

Este basidiomiceto possui elevada eficiência na produção de lacase, com altos rendimentos em curtos períodos de tempo, características que lhe confere potencial para a aplicação industrial e em biorremediações (LING et al., 2015).

O *Trametes versicolor* é o fungo lignolítico mais comumente encontrado nas madeiras de regiões de clima tropical, e seu nome faz referência ao padrão das bandas finas e coloridas em seu basidiocorpo. As cores variam conforme fatores externos e genéticos, sendo que a maioria das bandas são negras ou marrom claro, intercaladas com tons mais claros que vão do branco ao cinza, azuis, alaranjadas, entre outras (ZAMPIERI, 2006). Segundo Kim e Nicell(2006b) a lacase produzida pelo fungo *Trametes versicolor* tem um elevado potencial redox, o que torna seu uso bastante atrativo para a indústria.

2.6 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A forma e a composição do substrato lignocelulósico determinam o tipo e a concentração das enzimas produzidas por fungos da podridão branca. Materiais lignocelulósicos são indutores naturais da produção de enzimas lignocelulolíticas, sendo que a escolha do substrato adequado para a expressão de determinada enzima é uma das estratégias para a sua produção. Ao mesmo tempo em que induzem a expressão de lacases, estes materiais já disponibilizam para o

microrganismo os nutrientes necessários ao seu crescimento, reduzindo os custos da produção (ELISASHVILI et al., 2006, 2008).

2.6.1 Lignina

A lignina é um polímero fenólico complexo amorfo constituído de unidades de fenilpropanóides localizado em maior concentração na lamela média composta, e em menor concentração na parede secundária das plantas. Diferentemente da celulose, que é um polímero linear de carboidratos e da hemicelulose, que possui ramificações de carboidratos (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001; KLOCK et al., 2005; MELO, 2013). A sua formação plana ocorre devido a uma desidrogenação dos alcoóis precursores como: álcool sinapílico (siringil), álcool coniferílico (guaiacil) e álcool p-coumarílico (p-hidroxifenil-propano) (MANKAR; CHAUDHARI; SONI, 2012).

A lignina é o último componente da parede vegetal a ser incorporado, interpenetrando as fibrilas e conferindo resistência e rigidez ao tecido vegetal, o que reduz os danos causados por processos mecânicos, e também protege o tecido contra a ação de enzimas hidrolíticas de fitopatógenos, entre outros (VILAR, 2012).

As ligninas ocorrem em frações de 18 a 40% em peso em biomassas lignocelulósicas, sendo o terceiro componente mais importante na formação destes materiais. É um polímero natural de estrutura complexa e tridimensional formado por meio de ligações éter ou C-C com os monômeros: guaiacol, siringol e unidades de p-hidroxifenil (ZHAO et al., 2014).

As espécies coníferas apresentam uma maior concentração de lignina do que as folhosas (KLOCK et al., 2005), e a constituição das ligninas varia conforme a espécie da planta e até mesmo entre os diferentes tecidos de uma mesma espécie e de suas camadas na parede celular. A complexidade das ligninas se deve à presença de inúmeras unidades precursoras e suas combinações (VILAR, 2012).

A produção de papel e celulose gera resíduos que possuem as chamadas ligninas industriais, assim denominadas por serem subprodutos do beneficiamento da madeira. Estas ligninas podem ser utilizadas como combustível de baixo grau por meio da pirólise, que é capaz de transformar biomassa em combustível e outros produtos químicos (LI et al., 2014).

2.6.1.1 Métodos de extração de ligninas

A extração de ligninas pode ser realizada por meio de hidrólises e solubilizações da hemicelulose e da celulose com o emprego de reagentes químicos como os ácidos, os quais extraem a lignina em sua forma insolúvel. Ou ainda pela dissolução e remoção da lignina com posterior recuperação por processos químicos, como ocorre nas polpações básicas, ácidas ou com solventes orgânicos. Dentre estes métodos pode-se destacar a polpação organossolve, Kraft e polpação álcali, que hidrolisam a lignina, principalmente por oxidação (MORANDIM-GIANNETTI; SILVA; PEREIRA, 2014).

Segundo Saliba e colaboradores (2001) dentre os métodos de obtenção de ligninas, o isolamento é o que causa menos modificações estruturais, e é realizado com o preparo de amostras livres de extrativos. A lignina por isolamento pode ser obtida como resíduo, como derivado ou como extrativo.

O método Klason é um processo de isolamento como resíduo e ocorre por meio de hidrólise ácida, onde os polissacarídeos são removidos e a lignina é liberada como resíduo. No isolamento como derivado, o material lignocelulósico é tratado com reagentes químicos a fim de formar produtos insolúveis a serem separados. Em processos derivativos, podem ser empregados métodos distintos como o organossolve, que envolve solventes orgânicos e ácidos, ou o do ácido tioglicólico que reage com a lignina na presença de HCl diluído formando o ácido ligno-tioglicólico, e ainda como derivado da indústria de celulose que gera como subprodutos as ligninas sulfítica e a Kraft (sulfática). No processo extrativo são empregados solventes orgânicos, podendo originar três formas de lignina: a nativa, a obtida por biocatálises e a lignina da madeira moída (FENGEL; WEGENER, 1989).

De acordo com Swerts e coautores (2014) o método organossolve é um dos mais promissores, pois podem ser empregados diversos tipos de solventes orgânicos em mistura com água, e catalisadores como ácidos. Os solventes permitem a penetração dos reagentes no material lignocelulósico, facilitando a remoção da lignina presente no substrato.

No método organossolve a lignina extraída é livre de enxofre e possui peso molecular mais baixo, o que é bastante atrativo para fins industriais. Além disto, este tipo de extração é a mais adequada ambientalmente para se fracionar os componentes de biomassas vegetais (SANTOS et al., 2015).

Quinelato (2016) avaliou três métodos organossolve de extração de lignina em bagaço de cana-de-açúcar, com dioxano e ácido clorídrico, etanol ou álcali. O método organossolve com álcali apresentou maiores alterações na estrutura da lignina, com rupturas em ligações aromáticas. Os três métodos apresentaram ligninas com estruturas carbônicas diferentes entre si, porém o método empregando dioxano e HCl obteve a lignina mais semelhante à lignina de origem, sendo este considerado o método que causa menores alterações estruturais a esta molécula.

O método Pepper consiste em uma extração organossolve em um sistema de aquecimento com refluxo que emprega o dioxano como solvente orgânico e o HCl em meio aquoso o que favorece a solubilização da lignina. Apesar de causar algumas modificações estruturais, este método é um dos processos extrativos que obtém a lignina mais semelhante à lignina de origem (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001).

No desenvolvimento de novas metodologias analíticas para a caracterização química de palha e bagaço de cana-de-açúcar, Marabezi (2009) aplicou o método de isolamento Klason, e como padrão utilizou a lignina Pepper extraída do bagaço de cana-de-açúcar. Santos e colaboradores (2015) realizaram a caracterização de ligninas de madeiras obtidas pelo método organossolve (etanol / água) de *Corymbia citriodora* e de três espécies de *Eucalyptus*. Todos os extratos de lignina apresentaram elevado grau de pureza, baixos teores de açúcares e contaminantes inorgânicos.

Por sua vez Wang e coautores (2017) avaliaram diversos processos de pré-tratamento organossolve com 2-propanol/água a elevadas temperaturas para a deslignificação de madeira de *Eucalyptus*, a fim de se produzir substratos melhorados para a produção de bioetanol. O tratamento mais eficiente foi aquele realizado a temperatura de 200C° por um período de 120 min.

2.6.1.2 Análise de ligninas por Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier

A radiação do infravermelho (IR) abrange a região do espectro eletromagnético que vai do visível até a região das micro-ondas, e no estudo de moléculas orgânicas a porção de maior interesse encontra-se entre 4000 e 400 cm⁻¹. Cada substância possui um espectro no IR característico, porém as ligações

presentes em grupos de certos átomos geram bandas na mesma frequência para diferentes estruturas moleculares, de modo que a interpretação dos espectros IR é baseada em tabelas e bancos de dados padronizados (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1991).

A espectroscopia IR é um método não-destrutivo que possui alta sensibilidade e seletividade, precisão, tratamento de dados simplificado, facilidade operacional, celeridade analítica e o volume de amostra necessário é muito pequeno (GHAFAR; FAN, 2013). Esta técnica tem sido largamente aplicada em inúmeras áreas, como na indústria alimentícia e farmacêutica para análises qualitativas e quantitativas (XU et al., 2013).

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de grupos funcionais de material lignocelulósico tratado por diferentes processos (FONTANA; KRIEGER; RAMOS, 2002; SIM et al., 2012). A interpretação de um espectro de IR de uma amostra de lignina proporciona uma visão global de sua forma estrutural (MONTEIRO; PEREIRA; ABREU, 2013).

2.6.2 Madeiras

A madeira é um material de composição estrutural e química bastante variada devido a fatores como idade, carga genética e localização geográfica da planta de origem. Estas variações são responsáveis pelas propriedades físico-mecânicas entre as espécies de madeiras, e também entre as partes distintas de uma mesma planta. É constituída por compostos com alto grau de polimerização e pesos moleculares elevados, como a lignina, a celulose e a hemicelulose que são responsáveis pela morfologia estrutural da madeira (MOREIRA, 1999).

A madeira devido à sua ampla variedade de espécies e disponibilidade é considerada um material de alto valor comercial, em função das suas múltiplas aplicações (SANTOS et al., 2015). É um material que apresenta resistência à ação de solventes e compostos químicos, tal que a aplicação de um solvente pode afetar alguns de seus constituintes, enquanto que outros podem não sofrer nenhuma alteração. Esta característica comportamental permite a extração da lignina da madeira (KLOCK et al., 2005).

2.6.2.1 Bracatinga

A *Mimosa scabrella*, popularmente conhecida como bracatinga, é uma espécie arbórea de ciclo florestal curto com rápido crescimento nos seis primeiros anos de vida. O nome bracatinga tem origem na língua indígena guarani com a palavra “*abaracaatinga*” que significa “árvore ou mata de muitas plumas brancas”. Esta espécie ocorre em zonas de clima úmido e frio, portanto é bastante comum no sul do Brasil. Sua madeira é utilizada para produção de lenha, carvão vegetal, cabos de ferramentas, vigamentos, compensados, aglomerados, fabricação de móveis e pisos (CARPANEZZI et al., 1988).

É uma espécie arbórea de vida breve, em torno de 25 a 30 anos, com relevante importância na Região Metropolitana de Curitiba no estado do Paraná. Seu uso iniciou-se no início do século XX, em vilas conhecidas como bracatingais, que utilizavam a madeira para a produção de lenha (DA SILVA et al., 2016).

Outros usos da bracatinga são: medicinal, alimentação de animais, apícolas, cultivo de cogumelos comestíveis, e sua madeira pode ser utilizada na fabricação de móveis, pontaletes, carvão, construção civil e outros. No sul do país, onde é bastante comum a existência de agroecossistemas familiares de produção de leite à base de pastagens, esta espécie tem fundamental importância devido ao seu potencial de cobertura e sombreamento de pastos e gado (FERREIRA, 2012).

2.6.2.2 Peroba

A peroba, *Aspidosperma polyneuron*, é uma espécie arbórea que pertence à família *Apocynaceae*. Essa espécie possui clímax tolerante à sombra, é uma perenifólia, e é bastante comum no interior de florestas primárias densas. Pode atingir até 50 metros de altura, mas sua média é de 20 a 30 metros (KLEIN et al., 2016).

Dentre as espécies de *aspidospermas*, a peroba é considerada a de maior valor econômico, e toda a madeira desta espécie que é utilizada no Brasil é importada do Paraguai. Pode ser encontrada no norte da Colômbia, no extremo nordeste da Argentina, no norte da Venezuela, no noroeste do Peru, no norte e leste do Paraguai, e no Brasil em diversos estados, entre eles: o Paraná, São Paulo e Minas Gerais. A peroba possui um crescimento lento em seu estágio inicial, porém a

partir de 12 anos de idade seu crescimento é considerado moderado, e sua madeira possui baixa resistência ao ataque de organismos xilófagos (CARVALHO, 2004).

Os principais usos da madeira desta espécie são: madeira serrada e roliça, lenha, papel e celulose, extração de alcalóides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais, uso medicinal (chá da casca utilizado como antipirético), paisagismo e reflorestamento (CARVALHO, 2004). No Paraná, a peroba devido ao elevado valor comercial de sua madeira, sofreu exploração intensificada o que resultou na proibição de seu corte (PINAZO et al., 2009).

2.6.2.3 Pinus

Diversas espécies de pinus foram trazidas da Europa para o Brasil há mais de um século e vêm sendo cultivadas tanto para fins ornamentais, bem como para a obtenção de madeira. No ano de 1948, o Serviço Florestal do Estado de São Paulo introduziu o plantio de algumas espécies americanas de pinus, dentre elas a do *Pinus taeda*. Na década de 60, foi expandido o cultivo desta espécie para o sul, estendendo-se do planalto da região sul até o norte do Paraná (SHIMIZU, 2008).

O Brasil é o país com maior área de cultivo de *Pinus* spp. aproximadamente 1,7 milhões de hectares, sendo que mais de 1 milhão de hectares são ocupados com plantações de *P. taeda*, quase que em sua totalidade nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A madeira desta espécie apresenta um elevado valor econômico para o setor papeleiro e madeireiro, tendo investimentos em programas empresariais de reflorestamento sustentável e melhoramento florestal no sul do país (FERREIRA, 2005).

O *Pinus taeda* tornou-se a espécie arbórea mais cultivada nos planaltos da Região Sul do Brasil devido ao seu desenvolvimento acelerado, qualidade de sua matéria-prima que abastece o setor industrial florestal brasileiro, e pela sua resistência às condições edafoclimáticas regionais, como solos com pH baixo e deficientes em nutrientes, temperaturas relativamente baixas e geadas, e relevos acidentados (BOGNOLA, 2007).

Os principais usos da madeira extraída de *P. taeda* são: construção civil, vigas, papel e celulose, chapas e compensados, móveis, caixas e engradados, combustível e barcos (FERREIRA, 2005).

2.6.3 Resíduos agrícolas

Segundo Pires e Mattiazzo (2008) dentre as formas de disposição de resíduos, a reutilização é a forma mais viável tanto econômica, ambiental e socialmente, visto que minimiza o problema ambiental relacionado ao descarte inadequado. Os resíduos da atividade agrícola são aqueles gerados da produção agropecuária, ou seja, restos de culturas como palhas, cascas, bagaços e estrumes, sendo que estes materiais devem possuir baixa concentração de contaminantes.

A sustentabilidade do aproveitamento de resíduos agrícolas está diretamente relacionada à localização das culturas e a sua capacidade produtora, devido aos custos relacionados ao transporte e armazenamento deste material (ROCHA; ALMEIDA; CRUZ, 2017)

2.6.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A gramínea *Saccharum* spp. originária da Índia e Ásia, popularmente conhecida no Brasil como cana-de-açúcar, foi introduzida no país na época colonial. Atualmente movimenta boa parte da economia brasileira, com grande geração de renda e empregos, entretanto é uma atividade bastante poluente devido à elevada produção de resíduos (SCHNEIDER et al., 2012a).

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar e seus derivados (FAVERO; HAMERSKI; AQUINO, 2014), sendo os produtos gerados a partir da cana-de-açúcar: açúcar, etanol e energia, e seus subprodutos são: vinhaça, bagaço, torta de filtro, levedura seca e cinzas. O bagaço é composto por 2,5% de sólidos solúveis, 3% de cinzas, 44,5% de fibras lignocelulósicas e 50% de umidade. No Brasil o bagaço, quase em sua totalidade, cerca de 95%, é aproveitado em caldeiras para a geração de energia, tendo como resíduo a cinza do bagaço (BORTOLETTO et al., 2014).

2.6.3.2 Casca de soja

A soja amarela (*Glycine Max* (L.) Merrill) vem sendo cultivada no Oriente há mais de 5 mil anos, mas somente no século XX ganhou espaço no Ocidente com suas primeiras culturas nos EUA. A partir da década de 60 passou a ser cultivada na

América do Sul, mais precisamente na Argentina e no Brasil, e atualmente está entre as principais mercadorias agrícolas (REZENDE, 2012).

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de soja, perdendo em volume apenas para os EUA. Somente na safra 2015/2016 foram produzidas, no Brasil, mais de 95 milhões de toneladas em uma área com cerca de 33 milhões de hectares, ou seja, uma produção média de $2.882 \text{ kg hec}^{-1}$. Devido à sua elevada produção, dentre os resíduos lignocelulósicos da agroindústria brasileira, a casca de soja se destaca pelo volume gerado (EMBRAPA, 2017).

A casca da soja corresponde de 8 a 10% do peso do grão, e é um dos principais resíduos gerados na sua produção e manufatura. A estrutura deste resíduo é composta de 2 a 9% de lignina, 4 a 8% de pectinas, 9 a 15% de proteínas, 10 a 20% de hemicelulose, 29 a 51% de celulose, além de outros compostos orgânicos e inorgânicos como extrativos e cinzas (FONSECA, 2015). Uma alternativa para o uso de parte destes resíduos é o seu potencial como substrato para o cultivo de microrganismos lignocelulolíticos e como indutores na síntese de enzimas (SCIUTO, 2015).

2.6.3.3 Casca de trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais de maior valor econômico e cultural, e seu cultivo abrange cerca de 30% da produção mundial de cereais. No Brasil é fortemente cultivado no estado do Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2013), e no Oeste do Paraná. Possui grande impacto no agronegócio brasileiro, e movimenta setores de pesquisa e desenvolvimento, produção, industrialização e comercialização, gerando renda e emprego em diversas regiões do país (RODRIGUES et al., 2014).

Segundo Schneider e colaboradores (2012b) o estado do Paraná é o maior gerador de resíduos da produção de trigo no país, aproximadamente 1.489.666 toneladas ao ano, e somente a região Sul é responsável por 92% do total de resíduos gerados por este tipo de cultura.

2.7 DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS: FATORIAL FRACIONÁRIO

O modelo matemático estatístico de delineamento de experimentos (*Design of Experiments* – DOE) é normalmente utilizado para a modelagem e otimização de processos com múltiplas respostas. O DOE gera dados estatísticos confiáveis por meio da variação simultânea dos fatores de entrada, avaliando os seus efeitos e interações com base na variável de resposta (saída), sendo muito útil para a investigação de variáveis em um número reduzido de experimentos (GALDAMEZ; CARPINETTI, 2004; MORENO-VILET et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015).

O DOE gera arranjos experimentais balanceados e ortogonais de forma que todos os fatores sejam avaliados em todos os níveis. O arranjo mais comumente empregado é o fatorial completo, no qual o número de experimentos é igual ao número de níveis experimentais elevados ao número de fatores, sendo assim para um experimento com dois níveis, o número de experimentos (N) em razão dos fatores (k) a serem avaliados é dado por $N=2^k$. A viabilidade do experimento deve ser avaliada, visto que o número de fatores cresce de forma linear, enquanto que o número de experimentos correspondentes se altera de forma exponencial. Assim, um número reduzido de experimentos pode ser empregado assumindo-se a hipótese de esparsidade dos efeitos no qual frações experimentais são suficientes para avaliar a influência dos fatores na resposta (MONTGOMERY, 2008; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Segundo Teófilo e Ferreira (2006) ao se realizar um planejamento fatorial fracionário ocorre a mistura dos efeitos principais com os efeitos das interações, que se eleva gradualmente com o aumento da fração do planejamento. A resolução do planejamento define a ordem de negligência dos efeitos, sendo os mais comuns:

- a) resolução III: os efeitos principais não são confundidos entre si, porém são confundidos com efeitos de interações de dois fatores;
- b) resolução IV: os efeitos principais não são confundidos entre si e nem com interações de dois fatores, porém são confundidos com interações de três fatores, e algumas interações de dois fatores podem confundir-se entre si.
- c) resolução V: nem os efeitos principais, nem as interações de dois fatores se confundem com entre si, porém as interações de dois fatores se confundem com as de três fatores, e os efeitos principais podem ser confundidos com as interações de quatro fatores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

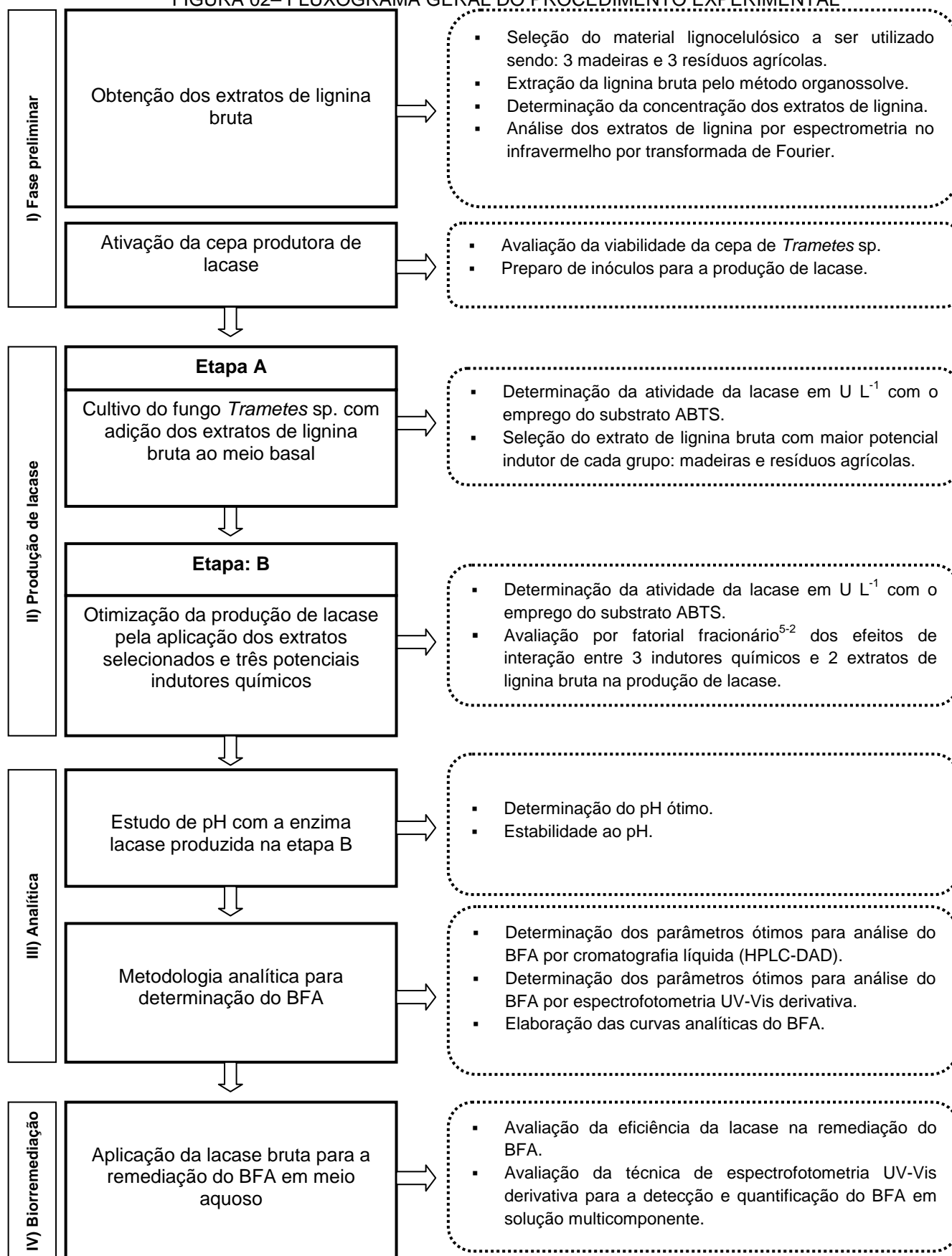
O presente trabalho possui caráter experimental e foi executado em escala de bancada no Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Os experimentos foram elaborados em fases, a saber:

- I. preliminar: que consistiu na obtenção de seis extratos de lignina bruta, por meio do método organossolve, de três espécies de madeiras (bracatinga, peroba e pinus) e três tipos de resíduos agrícolas (bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja e casca de trigo), bem como a ativação da cepa do fungo *Trametes* sp.
- II. produção de lacase: que foi realizada em duas etapas, sendo a primeira denominada de etapa A, que objetivou avaliar o potencial indutor dos extratos de lignina bruta para a produção de lacase pelo basidiomiceto *Trametes* sp. nas condições experimentais empregadas neste trabalho. A etapa B consistiu na aplicação de um delineamento de fatorial fracionário, com cinco fatores em dois níveis, para avaliar os efeitos das interações entre os indutores químicos (sulfato de cobre, siringol e dioxano), e os dois extratos de lignina bruta com maior potencial indutor na produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp.
- III. analítica: foi realizada a determinação do pH ótimo e estabilidade com ao pH da lacase obtida na etapa B de produção. Nesta fase também foram determinados os parâmetros analíticos para o BFA por cromatografia líquida (HPLC-DAD) e espectrofotometria UV-Vis derivativa.
- IV. biorremediação: realização de teste de bancada para avaliar a capacidade de remediação do BFA em meio aquoso pela lacase de *Trametes* sp. produzida na etapa B. Também foi avaliada a viabilidade do emprego da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa para a detecção e quantificação do BFA em solução multicomponente.

Na Figura 02 é possível visualizar o desenvolvimento prático deste trabalho por meio do fluxograma geral do procedimento experimental.

FIGURA 02– FLUXOGRAMA GERAL DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



FONTE: O autor (2017).

3.1 EXTRAÇÃO DAS LIGNINAS

O material lignocelulósico selecionado sofreu processo de extração de ligninas pelo método organossolve, sendo posteriormente caracterizado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

3.1.1 Seleção das matérias-primas para a extração de ligninas

Seis tipos de materiais lignocelulósicos foram selecionados para a extração de lignina, os quais foram divididos em dois grupos: madeiras e resíduos agrícolas, conforme o Quadro 01.

QUADRO 01 - MATÉRIAS-PRIMAS PARA A EXTRAÇÃO DE LIGNINA BRUTA

Tipo	Nome popular	Nome científico	Grupo de Ligninas
Angiosperma	Bracatinga	<i>Mimosa scabrella</i>	Madeiras
Angiosperma dicotiledônea	Peroba	<i>Aspidosperma polyneuron</i>	Madeiras
Gimnosperma	Pinus	<i>Pinus taeda</i>	Madeiras
Angiosperma monocotiledônea	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Saccharum officinarum</i>	Resíduos agrícolas
Angiosperma dicotiledônea	Casca de soja	<i>Glycine Max</i>	Resíduos agrícolas
Angiosperma monocotiledônea	Casca de Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	Resíduos agrícolas

FONTE: O autor (2016).

As amostras de peroba e bracatinga foram cedidas pelo departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e as demais amostras foram cedidas pelo Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Figura 03).

FIGURA 03 - MATERIAL LIGNOCELULÓSICO USADO NOS EXPERIMENTOS



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: 1 - Bracatinga, 2 - Peroba, 3 - Pinus,
4 - Bagaço de cana-de-açúcar,
5 - Casca de soja e 6 - Casca de trigo

3.1.2 Extração de lignina bruta

A extração de lignina bruta das matérias-primas empregadas foi realizada por meio de uma adaptação do método lignina organossolve utilizando 1,4-dioxano e ácido clorídrico (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001; MONTEIRO; PEREIRA; ABREU, 2013; QUINELATO, 2016; SALIBA et al., 2001).

Na extração de lignina bruta foi pesado, em béqueres de 250 mL, um total de 10g de cada material lignocelulósico com granulometria de 20 mesh. O solvente extrator foi preparado na proporção de 85:15 v/v com dioxano e HCl, e em cada béquer foi adicionado 200 mL deste solvente sobre o material pesado, permanecendo em repouso na temperatura de 25°C por 24 h.

Na sequência, as amostras foram aquecidas a 70°C \pm 5 sob agitação constante por 72 h, e o sobrenadante das amostras foi filtrado em lã de vidro *soft*, obtendo-se o extrato de lignina bruta de cada material. O material lignocelulósico residual da primeira extração sofreu uma nova extração com solvente, com agitação e aquecimento de 70°C \pm 5 por 3 h, e o sobrenadante das amostras foi filtrado em lã de vidro *soft* e adicionado ao extrato de lignina bruta de cada material. Os extratos foram concentrados por meio de evaporação, por um período de 48h, em capela de exaustão à temperatura ambiente (25°C) e armazenados em frascos tipo vial em congelador em temperatura de - 2°C \pm 2°.

3.1.3 Determinação da concentração dos sólidos solúveis

As concentrações de sólidos solúveis presentes nos extratos de lignina bruta foram obtidas por meio de análise gravimétrica realizada em estufa na temperatura de 105°C \pm 5. Cadinhos secos em estufa por um período de 24 h, dessecador com sílica, balança analítica, pinça e micropipetas foram empregados para esta determinação. As pesagens em triplicata foram realizadas em tempos subsequentes até que os extratos atingissem uma massa constante.

Os cálculos de média, desvio padrão, coeficiente de variação e análise de variância (ANOVA) foram realizados com o uso dos programas Excel® e MINITAB *Statistical Software*® versão 14.

3.1.4 Espectrometria no Infravermelho por transformada de Fourier

As análises de espectrometria no infravermelho (IR) dos extratos de lignina bruta dos grupos da madeira e dos resíduos agrícolas foram realizadas a fim de se avaliar os constituintes da cadeia polimérica da lignina e identificar os tipos de ligações e os grupos funcionais existentes.

As amostras dos extratos de lignina bruta foram evaporadas e o residual sólido (Figura 04) de cada amostra foi analisado em espectrômetro IR da marca Thermo Scientific modelo Nicolet iS10 Smart OMNI SAMPLER, localizado no laboratório da Central Analítica da Escola de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A região utilizada para análise foi de 4000 cm^{-1} a 800 cm^{-1} que está situado na região do infravermelho médio (MID).

FIGURA 04 - EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA SECOS



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: 1) Bracatinga;
2) Casca de trigo;
3) Casca de soja;
4) Bagaço de cana-de-açúcar;
5) Pinus.
6) Peroba

A interpretação dos espectros foi realizada conforme a Tabela 02, na qual estão compiladas informações de bandas no IR – MID características para ligninas.

TABELA 02 – ATRIBUIÇÕES DE BANDAS NO INFRAVERMELHO: MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (continua)

Faixa comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Polímero
3410 - 3460	Estiramento O-H	Celulose Lignina
3000	Estiramento C-H aromático	Lignina
2840 - 2937	Estiramento C-H em grupos metílicos ou metilênicos	Celulose Lignina
1750	Estiramento C=O de cetona, carbonila e ésteres não-conjugados	Hemicelulose
1705 - 1738	Ésteres livres	Lignina
1682 - 1703	Estiramento C=O de cetonas não-conjugadas	Lignina
1650 - 1680	Estiramento C=O cetona conjugada	Lignina (madeira)
1673	Ácido <i>p</i> -cumárico	Lignina (gramíneas)
1631 / 1639 / 1656	Estiramento C=O de cetonas conjugadas <i>p</i> -substituídas	Lignina (gramíneas)
1593 - 1605	Vibração do esqueleto aromático influenciada por C=O	Lignina
1500 - 1515	Vibração do esqueleto aromático	Lignina
1445 - 1470	Deformação assimétrica C-H em grupos metílicos	Lignina
1420 - 1434	Vibração do esqueleto aromático / deformação C-H no plano	Lignina
1427	Deformação angular de H-O no plano	Celulose Hemicelulose Lignina
1365 - 1370	Estiramento C-H em CH ₃ e grupamento fenólico H-O	Celulose Hemicelulose Lignina
1335	Vibração C-H / deformação angular H-O no plano	Celulose Hemicelulose Lignina
1325 - 1330	Vibração de anéis siringila e guaiacila condensados	Lignina
1327 / 1328	Estiramento C-O de anel siringil	Lignina
1280 / 1320	Deformação angular de C-H	Celulose
1265 - 1275	Vibração do anel guaiacílico influenciado por C=O	Lignina
1230 - 1240	Vibração C-O de anéis siringílicos, guaiacílicos e de fenóis	Lignina
1235	Unidades sinapila e <i>p</i> -cumarila	Lignina (gramíneas)
1212 - 1233	Estiramento C-C, C-O e C=O	Lignina
1165 - 1168	Estiramento C=O grupos de ésteres conjugados	Lignina
1160	Estiramento assimétrico C-O-C	Celulose Hemicelulose
1139 / 1140	Estiramento C-O de alcoóis secundários	Lignina (madeira mole)
1125 - 1128	Unidades de siringila / estiramento de C-O em álcool secundário	Lignina
1110	Deformação C-H anéis aromáticos (unidades siringila)	Lignina
1040 - 1185	Estiramento de C-O de alcoóis secundários e éteres alifáticos	Lignina
1043 / 1044	Estiramento C-O, C-C e C-OH	Celulose Hemicelulose Lignina
1030 - 1038	Deformação em C-H de anel aromático no plano e em C-O de alcoóis primários	Lignina
966 - 990	Deformação fora do plano em -HC=CH-	Lignina
930	Ligação glicosídica	Celulose Hemicelulose

TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DE BANDAS NO INFRAVERMELHO: MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (conclusão)

Faixa comprimento de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Polímero
910 – 925	Deformação fora do plano C-H em anel aromático	Lignina
815 – 915	Deformação C-H aromático	Lignina
875	Ligação glicosídica	Hemicelulose
850 – 858	Deformação C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacila	Lignina
843 – 845	Vibração C-H aromático fora do plano	Lignina
830 – 835	Deformação C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de unidades sirringila	Lignina
817 – 830	Deformação C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacila	Lignina

FONTE: Adaptado de CHEN et al. (2015a); GHAFAR; FAN (2013), KUBO; KADLA (2005), SALIBA et al. (2001), SHI; LI (2012), SILLS; GOSSETT (2012) e XU et al. (2013).

3.2 CEPA PRODUTORA DE LACASE

A cepa do basidiomiceto *Trametes* sp. foi obtida da coleção de culturas do departamento de Microbiologia e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) por meio de doação.

3.2.1 Manutenção e ativação da cepa de *Trametes* sp.

A cepa foi mantida em meio batata dextrose ágar (BDA) em refrigerador a 4°C ± 2 até o momento de sua ativação. Na ativação do basidiomiceto foram utilizadas placas de Petri com diâmetro de 100 mm contendo meio BDA solidificado. Foram retirados da cepa *plugs* com ágar e micélio de aproximadamente 15 mm². Estes foram transferidos assepticamente para placas de Petri e incubados a 30°C ± 2 por 5 dias com fotoperíodo de 12 h.

3.3 MEIO DE CULTIVO

A Tabela 03 apresenta a composição do meio de cultivo submerso utilizado como base para todos os experimentos realizados neste estudo. Foram utilizadas quatro fontes de nitrogênio e uma fonte de carbono de acordo com a metodologia proposta por Tinoco e colaboradores (2011).

TABELA 03 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO BASE

Fonte	Composto	g L ⁻¹
Nitrogênio	Extrato de malte	20
	Extrato de levedura	10
	Peptona	10
	Triptona	5
Carbono	Glicose	10

FONTE: O autor (2016).

O meio de cultivo base foi preparado com água de sistema de purificação por osmose reversa, modelo RO/0410 da marca Permution, e o pH foi ajustado inicialmente em 6,00.

As fontes de nitrogênio e carbono foram pesadas em frascos Erlenmeyer distintos, a fim de se evitar a reação de *Maillard*. Os meios foram autoclavados por um período de 20 min em autoclave vertical da marca Phoenix à pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C, no Laboratório de Microbiologia (UTFPR). Após o resfriamento, ambos os preparados (fonte de nitrogênio e fonte de carbono) foram misturados em capela com fluxo laminar de ar.

3.4 INDUTORES DE LACASES

Os indutores foram preparados de forma asséptica utilizando tubos de ensaio, material de laboratório e água estéril. Após o preparo, os tubos foram envoltos em papel alumínio e armazenados em congelador a $-2^{\circ}\text{C} \pm 2$. As concentrações das soluções dos indutores estão indicadas na Tabela 04.

TABELA 04 – CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DOS INDUTORES DE LACASE

Indutor	Marca	Concentração (mol L ⁻¹)
2,6 – Dimetoxifenol (Siringol) >98%	Sigma-Aldrich	0,1
1,4 – Dioxano	Merck	0,1
Sulfato de cobre (CuSO ₄)	Carlo Erba	0,1

FONTE: O autor (2016).

3.5 CULTIVO E ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LACASE

O estudo da produção da lacase foi dividido em duas etapas. A primeira, etapa A, objetivou avaliar a viabilidade de cultivo do fungo *Trametes* sp. nas condições experimentais definidas neste trabalho e selecionar o extrato de lignina com maior potencial indutor de cada grupo (madeiras e resíduos agrícolas).

A etapa B compreendeu a otimização da síntese de lacase por meio de um delineamento de experimentos com o uso dos extratos de lignina selecionados na etapa A, juntamente com mais três potenciais indutores químicos para esta enzima.

No Quadro 02 estão resumidas as condições experimentais aplicadas à produção de lacase para as etapas A e B.

QUADRO 02 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A PRODUÇÃO DE LACASE

Condições Experimentais	Etapa A	Etapa B
Nº de replicatas	2	2
Tipo de frasco	Penicilina	Erlenmeyer
Concentração dos extratos de lignina	1 g L ⁻¹	1 g L ⁻¹
Concentração dos indutores químicos	Não aplicável	1 mmol L ⁻¹ (aplicado no 4º dia de incubação)
Volume do meio de cultivo	10 mL	25 mL
Inóculo de <i>Trametes</i> sp.	Um <i>plug</i> de 5mm ² de cepa ativada com 5 dias	2 <i>plugs</i> de 15mm (d) de cepa ativada com 5 dias
Incubação	Submersa, estática, 30°C ± 2 e fotoperíodo de 12 h	Submersa, estática, 30°C ± 2 e fotoperíodo de 12 h
Tempo do experimento	16 dias	24 dias
Extração enzimática	6º, 12º e 16º dia	7º, 11º, 16º, 21º e 24º dia
Centrifugação	1,5 mL por 10 min a 14.000 x g	1,5 mL por 10 min a 14.000 x g
Armazenamento do extrato bruto de lacase	-2°C ± 2°C	-2°C ± 2°C

FONTE: O autor (2016).

3.5.1 Etapa A: estudo da viabilidade de *Trametes* sp. e seleção dos extratos de lignina bruta

O experimento inicial foi realizado em duplicata e as análises de atividade de lacase foram realizadas em triplicata.

Os cultivos foram realizados em frascos de penicilina, vedados com tampões de algodão e cobertos com papel *kraft*, autoclavados por um período de 20 min em autoclave vertical da marca Phoenix à pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C. Os extratos de lignina bruta foram distribuídos individualmente nos frascos de penicilina em volumes pré-definidos conforme a sua concentração de forma que o meio de cultivo apresentasse uma concentração de 1g L⁻¹ de lignina.

O solvente extrator residual presente os extratos de lignina bruta foi evaporado a temperatura ambiente, sem a retirada dos tampões de algodão a fim de se evitar contaminações cruzadas, em capela de exaustão por 96 h.

Um volume de 10 mL de meio de cultivo base (Tabela 3) foi dispensado em cada frasco de penicilina contendo o extrato de lignina seco, e este foi misturado ao

meio com o auxílio de uma espátula estéril para que ficasse inicialmente disperso na solução, visto que é insolúvel em água. A inoculação dos fungos foi realizada adicionando-se um *plug* de aproximadamente 5 mm² de micélio de cepa ativada em BDA com 5 dia sem cada frasco de penicilina (Figura 05).

FIGURA 05 - *PLUGS* (5 mm²) EM INOCULAÇÃO DE *Trametes* sp. NA ETAPA A



FONTE: O autor (2016).

Os frascos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a temperatura de 30°C ± 2 com fotoperíodo de 12 h, por um período de 16 dias, e as extrações foram realizadas no 6º, 12º e 16º dias de incubação.

As alíquotas do caldo de cultivo foram extraídas com o uso de ponteiras estéreis e micropipeta, retirando-se um volume de 1,5 mL de cada experimento após suave agitação.

As amostras foram centrifugadas em Eppendorfs por 10 minutos a 14.000 x g em centrífuga MiniSpin Plus Eppendorf. O sobrenadante de cada experimento foi analisado conforme o item 3.6, identificado e congelado à temperatura de -2°C ± 2.

O estudo da produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. na presença de extratos de ligninas de madeiras e de resíduos agrícolas como indutores foi realizado por meio de análises da atividade enzimática no 6º, 12º e 16º dia de cultivo, e a seleção dos extratos de lignina com maior potencial indutor de lacases foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey com 95% de confiança empregando-se os resultados máximos de atividade enzimática de lacase obtidos ao 16º dia de cultivo.

3.5.2 Etapa B: otimização da produção de lacase por *Trametes* sp. pela aplicação de indutores

A segunda etapa do experimento foi realizada por meio de um delineamento de experimentos (DOE) fatorial fracionário⁵⁻², com a aplicação de 5 fatores em 2 níveis, com a execução de 16 experimentos aleatórios com resolução V, conforme o Quadro 03, executado no *software* de licença fechada MINITAB *Statistical Software*®, versão 14.

O DOE objetivou avaliar os efeitos das interações entre os fatores selecionados, ou seja, entre os dois extratos de lignina que obtiveram melhor desempenho indutor na primeira etapa e mais três substâncias químicas: sulfato de cobre, dioxano e siringol, a fim de se obter uma otimização na produção da enzima lacase. O experimento foi realizado em duplicata e as análises de atividade de lacase foram realizadas como descrito no item 3.6.

QUADRO 03 – PARÂMETROS DO FATORIAL FRACIONÁRIO⁵⁻² REALIZADO PARA O *Trametes* sp.

Fatores (k)	Níveis		Nº Experimentos (N)
	+	-	
Extrato de lignina do grupo Madeiras	1 g L ⁻¹	0 g L ⁻¹	16
Extrato de lignina do grupo Resíduos Agrícolas	1 g L ⁻¹	0 g L ⁻¹	
CuSO ₄ – sulfato de cobre	1 mmol L ⁻¹	0 mmol L ⁻¹	
1,4 Dioxano	1 mmol L ⁻¹	0 mmol L ⁻¹	
Siringol	1 mmol L ⁻¹	0 mmol L ⁻¹	

FONTE: O autor (2016).

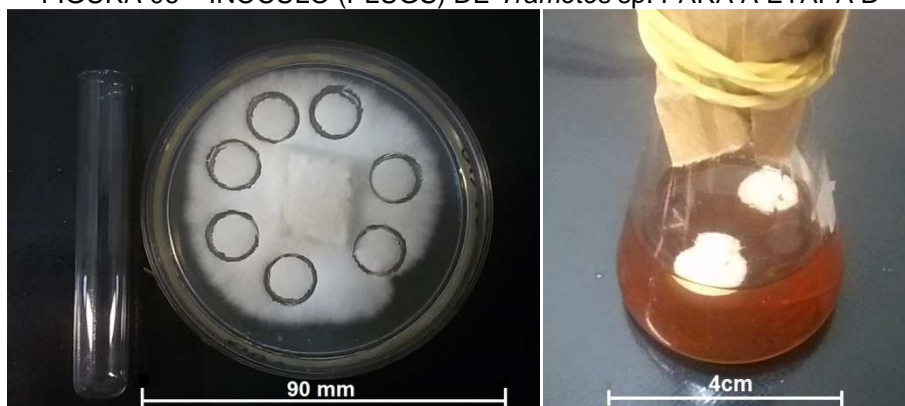
Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL, com tampões de algodão e vedados com papel *Kraft* e elástico, autoclavados por um período de 20 min em autoclave vertical da marca Phoenix à pressão de 1,1 atm e temperatura de 121°C, no Laboratório de Microbiologia (UTFPR).

Os extratos de lignina bruta foram distribuídos individualmente nos frascos Erlenmeyer em volumes pré-definidos conforme a sua concentração de forma que o meio de cultivo apresentasse uma concentração de 1g L⁻¹ de lignina. O solvente extrator residual presente os extratos de lignina bruta foi evaporado a temperatura ambiente, sem a retirada dos tampões de algodão a fim de se evitar contaminações cruzadas, em capela de exaustão por 96 h.

Um volume de 25 mL de meio de cultivo base (Tabela 03) foi dispensado em cada frasco Erlenmeyer contendo o extrato de lignina seco, e este foi misturado ao meio com o auxílio de uma espátula estéril para que ficasse inicialmente disperso na solução, pois o mesmo é insolúvel em água.

A inoculação do fungo *Trametes* sp. foi realizada adicionando-se dois *plugs* de 15 mm de diâmetro contendo o micélio da cepa ativada em BDA com 5 dia sem cada frasco Erlenmeyer, conforme a Figura 06.

FIGURA 06 – INÓCULO (PLUGS) DE *Trametes* sp. PARA A ETAPA B



FONTE: O autor (2016).

Os frascos inoculados foram incubados em estufa bacteriológica a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2$ com fotoperíodo de 12 h, por um período de 24 dias. No 4º dia foram adicionados os indutores de forma que a concentração no meio de cultivo fosse de 1 mmol L^{-1} para cada indutor. As extrações do caldo de cultivo contendo as enzimas foram realizadas no 7º, 11º, 16º, 21º e 24º dias de incubação. As alíquotas do caldo de cultivo foram extraídas com o uso de ponteiros estéreis e micropipeta, retirando-se um volume de 1,5 mL de cada experimento após suave agitação.

As amostras foram centrifugadas em Eppendorfs por 10 minutos a $14.000 \times g$ em centrífuga MiniSpin Plus Eppendorf. O sobrenadante de cada experimento foi analisado conforme o item 3.6, identificado e congelado a temperatura de $-2^{\circ}\text{C} \pm 2$.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE

A determinação da atividade enzimática da lacase foi realizada por meio da oxidação do substrato 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) - (ABTS)

em tampão Mcllvaine (citrato-fosfato) 0,15 mol L⁻¹ em pH 4,00 baseada na metodologia proposta por Buswell; Cai; Chang (1995).

O reagente ABTS com 98% de pureza foi adquirido da marca Sigma-Aldrich, e preparado em concentração de 20 mmol L⁻¹ em água de osmose reversa. As análises foram realizadas em placas para cultura de tecidos com 96 poços da marca SPL Life Science, (Inc.) em espectrofotômetro modelo *Epoch 2 – microplate reader* da marca Biotek Instruments, (Inc.) à temperatura de 40°C com agitação orbital, com leituras em 420 nm após 6 e 7 min de reação.

As análises foram realizadas em triplicata, em um volume total de 200 µL (conforme a Tabela 05). Para o branco foi utilizado o meio de cultivo base ao invés do caldo enzimático bruto. Quando necessário as amostras foram diluídas em 10, 100 ou 1000 vezes, utilizando-se como diluente o tampão MacIlvaine 0,15 mol L⁻¹ em pH 4,00.

TABELA 05 – COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE DE LACASE

Solução	Volume (µL)
Tampão Mcllvaine pH 4,0	160
Solução ABTS 20 mmol L ⁻¹	20
Caldo enzimático bruto	20

FONTE: O autor (2016).

Os resultados da atividade de lacase foram expressos em U L⁻¹, sendo que 1 U corresponde a 1 µmol de produto formado por minuto de reação.

O tratamento estatístico foi realizado por meio de ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança, no *software* MINITAB *Statistical Software*®.

A atividade da lacase foi obtida a partir das absorbâncias corrigidas para o valor do branco e do fator de diluição por meio da aplicação da fórmula:

$$\left(U L^{-1} = \frac{\Delta Abs \times V_T}{\varepsilon \times d \times \Delta t \times V_A} \right) \quad (1)$$

Sendo:

ΔAbs = (Absorbância final - Absorbância inicial)

ε = coeficiente de extinção molar do ABTS a 420 nm ($\varepsilon_{420} = 36 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_A = volume, em µL, do extrato enzimático bruto utilizado na reação

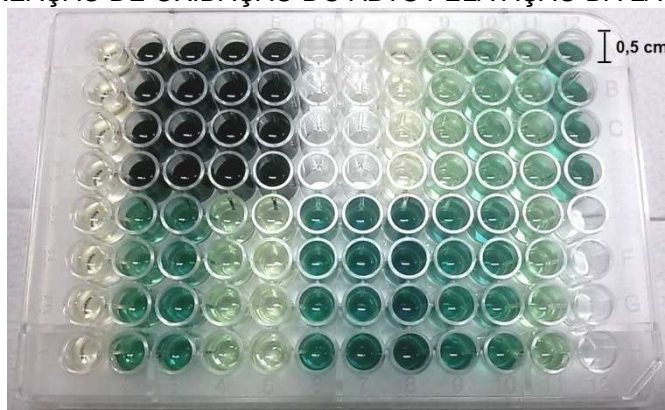
V_T = volume, em µL, do total analisado (amostra + reagentes)

Δt = tempo de reação (1 min)

d = altura do líquido (no caso da marca da placa de 96 poços utilizada $d=0,5$ cm, para $V_T=200$ μ L).

O ABTS é oxidado pela lacase a um radical catiônico de coloração verde escuro, pelo qual é mensurada a atividade desta enzima (KIM; NICELL, 2006b; PRASETYO et al., 2016). A Figura 07 demonstra diversos graus de oxidação de ABTS por lacase de *Trametes* sp. em placa de cultivo de tecidos com 96 poços.

FIGURA 07 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO ABTS PELA AÇÃO DA LACASE DE *Trametes* sp.



FONTE: O autor (2016).

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DESNATURANTE DA ACETONITRILA

Devido à baixa solubilidade do BFA em água, este composto foi primeiramente diluído em acetonitrila (ACN), para posteriormente ser diluído em tampão para a realização dos experimentos de biorremediação.

A fim de se saber se este solvente causa desnaturação da enzima, foi realizado um teste em solução tampão contendo 1,2% (v/v) de ACN, juntamente com uma amostra de lacase bruta. Em um frasco Erlenmeyer de 50 mL foram dispensados 25 mL de tampão McIlvaine 10 mmol L^{-1} pH 5, 300 μ L de ACN pura e 100 μ L de lacase bruta. O experimento foi incubado a temperatura de 25°C com agitação de 150 rpm.

A determinação da atividade foi realizada em triplicata conforme o item 3.6, no t_0 (antes da aplicação da ACN), e no t_1 e t_2 (após 1 e 2 horas de reação, respectivamente). Os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança.

3.8 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO

A determinação do pH ótimo para a lacase produzida por *Trametes* sp. foi realizada em solução tampão Mcllvaine (citrato-fosfato) 10 mmol L⁻¹ nos valores de pH de 4, 5, 6 e 7, valores estes que abrangem a faixa de tamponamento do citrato-fostato (pH 2,6 a 7,6) (DAWSON et al., 1986). Os ensaios, em duplicatas, foram realizados em tubos de ensaio com volume reacional de 3 mL contendo 100 µL de lacase bruta em tampão a temperatura de 25°C.

Após a homogeneização, as amostras foram submetidas a análises de atividade enzimática conforme descrito no item 3.6. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e por teste de Tukey com 95% de confiança.

3.9 ESTABILIDADE AO pH

As amostras dos ensaios realizados no item 3.8 foram incubadas em temperatura de 25°C com agitação de 150 rpm, e iluminação ambiente por um período de 72 h. A estabilidade das lacases foi determinada por meio das análises de atividade conforme descrito no item 3.6. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e por teste de Tukey com 95% de confiança.

3.10 METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO BISFENOL A

A determinação do BFA em meio aquoso foi realizada com o emprego das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta com arranjo de diodos (HPLC-DAD), e espectrofotometria UV-Vis derivativa de primeira ordem.

3.10.1 Instrumentação

Nas análises do BFA foram utilizados os equipamentos de espectrofotometria UV-Vis modelo UV-1650PC da marca Shimadzu e cromatógrafo líquido de alta eficiência (*High performance liquid chromatography* – HPLC) modelo LC10ATVP da

marca Shimadzu com detector no ultravioleta (UV) com arranjo de diodos (*diode array detector* - DAD) modelo SPD-M10AVP Shimadzu.

A obtenção de água purificada foi realizada por meio de um sistema de purificação por osmose reversa RO/0410 da marca Permution. As pesagens foram efetuadas em balança analítica modelo UMark 250A da BEL Engineering, com precisão de 0,0001g.

3.10.2 Fases móvel e estacionária para HPLC-DAD

A fase estacionária empregada foi do tipo reversa no modelo C-18 Gemini Phenomenex 5 μm (250 x 4,60mm). A fase móvel utilizada consistiu de uma mistura de acetonitrila grau cromatográfico >99,9% da Merck e água de osmose reversa, na proporção de 70:30 (v/v), respectivamente. A fase móvel foi filtrada, em sistema a vácuo, com membrana hidrofóbica PTFE 0,45 μm , e desgaseificada em ultrassom, modelo Ultra Sonic Cleaner USC-800A da marca Unique por 30 min, sendo os últimos 5 min sob vácuo.

3.10.3 Padrão analítico e solvente cromatográfico

O padrão de BFA (>99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich, e o solvente empregado no preparo das soluções de BFA foi a acetonitrila (ACN) 99,9% da marca Merck.

3.10.4 Elaboração das curvas analíticas do bisfenol A

As curvas analíticas para quantificação do BFA por HPLC-DAD e UV-Vis foram construídas pela interpolação de três curvas (A, B e C), preparadas individualmente, a partir de soluções primárias do padrão de BFA em ACN em concentração de 40 g L⁻¹ cada (Quadro 04). As diluições dos pontos da curva foram realizadas com o uso de tampão McIlvaine 10 mmol L⁻¹, pH 5.

QUADRO 04 - DADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DO BISFENOL A

Curvas primárias	Soluções primárias	Conc. [g L ⁻¹]	Soluções secundárias	Conc. [g L ⁻¹]	Pontos da curva analítica	Conc. [mg L ⁻¹]
A	A1	40	A2	1	1	1
					2	2,5
					4	10
B	B1	40	B2	5	3	5
					5	20
					6	40
					8	80
C	C1	40	-----	-----	7	60
					9	100
					10	120

FONTE: O autor (2017).

3.10.4.1 Parâmetros de análise e curva analítica para HPLC-DAD

As análises foram realizadas pela injeção de 20 µL de amostra, em modo isocrático, com vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura de forno de 40°C. O comprimento de onda selecionado foi de 235 nm, e o tempo de corrida foi de 8 min, visto que o tempo de retenção (TR) do BFA foi de 3,8 min.

A curva analítica do BFA para o método de HPLC-DAD foi obtida por meio da interpolação das curvas primárias A, B e C, resultando em uma curva com 10 pontos (1 – 120 mg L⁻¹) com equação de reta igual a $y=2726.x + 67347$ e um $R^2 = 0,991$ (APÊNDICE G), que indica uma boa linearidade na faixa de trabalho selecionado.

A fim de se eliminar interferências da matriz e das diluições, os pontos da curva analítica sofreram o mesmo pré-tratamento que foi empregado nas amostras para a biorremediação. Deste modo, foram retirados 250 µL de cada ponto da curva e adicionados a 750 µL de ACN em Eppendorf, sendo centrifugados por 15 min a 14.000 x g. O sobrenadante foi filtrado em filtro de Nylon 0,45 µm com 13 mm de diâmetro antes da injeção no HPLC-DAD.

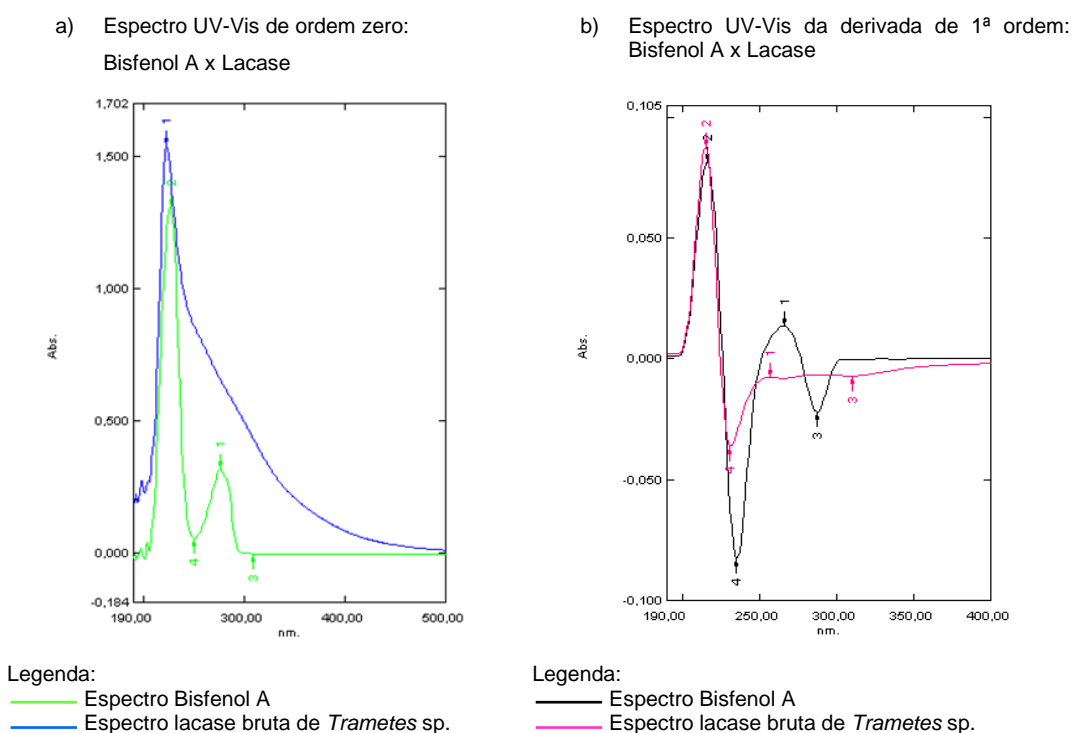
3.10.4.2 Parâmetros de análise e curva analítica para espectrofotometria UV-Vis derivativa

Devido à sobreposição dos picos da lacase bruta e do BFA no espectro de ordem zero, conforme Figura 08-a, foi empregada a técnica do ponto de anulação (*zero crossing*) em espectrofotometria derivativa, sendo executada uma varredura

com velocidade média entre 200 a 400 nm, com a suavização do espectro para 1ª derivada, com fator igual a 1 e $\Delta\lambda=10$.

A redução da absorbância do BFA, devido à sua degradação pela lacase, foi então observada por meio da 1ª derivada do espectro na região de 288 nm, pois neste comprimento de onda da derivada não ocorreu sobreposição dos picos, sendo possível observar apenas o BFA, conforme a Figura 08-b.

FIGURA 08 – ESPECTROS DO BISFENOL A x LACASE: ORDEM ZERO E 1ª ORDEM



FONTE: O autor (2017).

A curva analítica do BFA para o método de espectrofotometria derivativa UV-Vis também foi obtida por meio da interpolação das curvas primárias A, B e C, resultando em uma curva com 10 pontos ($1 - 120 \text{ mg L}^{-1}$) com equação de reta igual a $y = -0,001.x + 0,001$ e um $R^2 = 0,998$ (APÊNDICE H).

3.11 BIORREMEDIAÇÃO DO BISFENOL A

Os experimentos para a degradação do BFA em meio aquoso tamponado foram realizados em triplicata. Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer de 25 mL vedados, em banho-maria à temperatura de 40°C e agitação de 150 RPM por

um período de 18 h. As replicatas continham um volume reacional de 5 mL de tampão McIlvaine 10 mmol L⁻¹ em pH 5, com BFA em concentração de 100 mg L⁻¹ e lacase bruta com atividade equivalente a 500 U L⁻¹.

O controle recebeu lacase bruta que foi previamente inativada com HCl 39% na proporção de 1:20 (v/v). Devido à baixa solubilidade do BFA em água, as adições nos experimentos foram executadas a partir de uma solução-mãe em concentração 10 g L⁻¹ de BFA em ACN.

As amostragens foram realizadas no tempo zero, antes da aplicação do caldo enzimático, e após 1, 2, 4, 8, 10 e 18 h de reação e analisadas em HPLC-DAD e espectrofotometria derivativa UV-Vis.

Um pré-tratamento foi empregado nas amostras a fim de inativar a lacase e melhorar o sinal analítico, de modo que foi retirado um volume de 250 µL de cada replicata em cada tempo, e a este foi adicionado 750 µL de ACN em Eppendorf. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 14.000 x g e o sobrenadante foi analisado.

Os valores médios e o desvio-padrão de cada análise foram calculados a partir de três experimentos independentes. Os resultados obtidos a partir das metodologias de espectrofotometria derivativa e de HPLC-DAD foram submetidos à análise estatística de diferença entre as médias (ANOVA) e por teste de Tukey com nível de confiança de 95 %, a fim de se saber se os resultados obtidos por ambas as técnicas corroboram entre si.

3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As análises estatísticas como média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos neste trabalho foram realizadas no *software* Excel[®]. Os testes de distribuição normal, análises de variância e delineamento de experimentos (*Design of experiments* - DOE) foram realizados no *software* MINITAB Statistical Software[®].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA

4.1.1 Concentração dos extratos de lignina bruta

A extração da lignina dos materiais lignocelulósicos resultou em seis extratos líquidos concentrados de lignina bruta. Na Tabela 06 estão apresentadas as concentrações de sólidos dissolvidos encontradas para os materiais lignocelulósicos nos extratos obtidas por meio de análise gravimétrica.

TABELA 06 – CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA

Extrato de Lignina Bruta	Sigla	Concentração (g L ⁻¹)
Bracatinga	BA	113 ± 3,61
Bagaço de cana-de-açúcar	BC	141 ± 4,36
Casca de Soja	CS	112 ± 4,36
Casca de trigo	CT	189 ± 3,61
Peroba	PE	186 ± 8,19
Pinus	PI	206 ± 9,54

FONTE: O autor (2016).

Os dados constantes na Tabela 6 não afetam a dinâmica do experimento, pois servem apenas como base para os cálculos da concentração final dos extratos de lignina bruta no meio de cultivo, a fim de se obter um volume reacional normalizado.

A ANOVA das concentrações dos extratos de lignina bruta (Tabela 07) mostra que há diferenças significativas entre as médias das concentrações dos extratos, visto que o valor de p foi inferior a 0,05, e o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado. O teste de Tukey, (95% de confiança), revelou que não houve diferença significativa apenas entre as médias dos extratos de bracatinga e casca de soja, bem como entre os extratos de peroba e casca de trigo.

TABELA 07 – ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA PARA AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}	Valor p
Extratos de lignina bruta	5	25436,5	5087,3	137,49	3,11	0,000
Erro	12	444,0	37,0	---	---	---
Total	17	25880,5	---	---	---	---

R²: 97,57%

FONTE: O autor (2016).

A diferença entre as médias dos extratos pode ser devida a variações na concentração e na estrutura das ligninas do material lignocelulósico *in natura*, ou até mesmo devido a fatores estruturais dos tecidos lignocelulósicos que podem apresentar maior grau de resistência frente ao tratamento empregado na extração das frações de lignina. Ainda pode ser devido à presença de outros componentes no extrato de lignina bruta, como hemicelulose e celulose, visto que a análise quantificou os sólidos dissolvidos totais nos extratos, e não apenas as ligninas.

4.1.2 Análise dos extratos de lignina bruta por Espectrometria no Infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros dos extratos de lignina bruta de ambos os grupos, madeiras e resíduos agrícolas, apresentaram bandas características para ligninas (Tabela 8). No grupo madeiras estão os extratos de bracatinga (BA), peroba (PE) e pinus (PI), e no grupo de resíduos agrícolas estão os extratos de bagaço de cana-de-açúcar (BC), casca de soja (CS) e casca de trigo (CT). Os espectros individuais de cada extrato de lignina estão dispostos na seção de apêndices ao final deste trabalho.

TABELA 8 – BANDAS FTIR PARA OS EXTRATOS DE LIGNINA DE MADEIRA, RESÍDUOS AGRÍCOLAS E VALORES RELATADOS NA LITERATURA
(continua)

Faixa de onda (cm ⁻¹)	Polímero	Madeiras			Resíduos Agrícolas			Valores relatados na literatura						Atribuição
		BA	PE	PI	BC	CS	CT	1	2	3	4	5	6	
3410 - 3460	C / L	-	-	-	-	-	-	3410	-	3430	3420 - 3440	3420 - 3440	3420 - 3440	Estiramento O-H
2840 - 2937	C / L	2920	2854 2924	2856 2926	2849 2917	2850 2918	2853 2924	2842 2933	-	2842	2900	2900	2900	Estiramento C-H em grupos metílicos ou metilênicos
1705 – 1738	L	1711 1726	1709	1708	1706	1713	1711	1706	1712	-	1710	1710	-	Ésteres livres
1682 – 1703	L	-	-	-	-	-	-	-	-	1698	-	-	-	Estiramento C=O de cetonas não-conjugadas
1650 – 1680	L-MAD	1658	1678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Estiramento C=O cetona conjugada
1631 / 1639 1656	L-GMN	-	-	-	1631	1656	1656	1639	-	-	-	-	-	Estiramento C=O de cetonas conjugadas <i>p</i> -substituídas
1593 – 1605	L	-	1604	-	1604	-	-	1602	-	1597	1600	1600	-	Vibração do esqueleto aromático influenciada por C=O
1500 – 1515	L	1503 1513	1514	1512	1514	1514	1514	1514	1510	1508	-	-	-	Vibração do esqueleto aromático
1445 – 1470	L	1452 1462	1461	1454	1460	1454	1460	1461	1456	1460	1460	1460	1460	Deformação assimétrica C-H em grupos metílicos
1420 – 1434	L	-	1426	1420	1424	-	1421	1421	1420	1422	-	-	-	Vibração do esqueleto aromático / deformação C-H no plano
1427	C / H / L	1427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Deformação angular de H-O no plano
1365 – 1370	C / H / L	-	1366	-	-	-	-	-	-	-	1370	1370	1370	Estiramento C-H em CH ₃ e grupamento fenólico H-O
1325 – 1330	L	-	-	-	-	-	-	1326	-	1326	1330	1330	-	Vibração de anéis siringila e guaiacila condensados
1327 / 1328	L	1327	1328	-	1328	-	-	-	1328	-	-	-	-	Estiramento C-O de anel siringil
1265 – 1275	L	1268	1262	1266	-	-	-	-	1271	-	-	-	-	Vibração do anel guaiacílico influenciado por C=O

TABELA 8–BANDAS FTIR PARA OS EXTRATOS DE LIGNINA DE MADEIRA, RESÍDUOS AGRÍCOLAS E VALORES RELATADOS NA LITERATURA

(continua)

Faixa de onda (cm ⁻¹)	Polímero	Madeiras			Resíduos Agrícolas			Valores relatados na literatura						Atribuição
		BA	PE	PI	BC	CS	CT	1	2	3	4	5	6	
1230 – 1240	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1230	1230	1230	Vibração C-O de anéis siringicos, guaiacólicos e de fenóis
1212 – 1233	L	1223	1220	-	-	1212	1221	-	-	1219	-	-	-	Estiramento C-C, C-O e C=O
1165 – 1168	L	-	-	-	1168	-	-	-	-	-	1166	1166	-	Estiramento C=O grupos de ésteres conjugados
1160	C / H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		1160	Estiramento assimétrico C-O- C
1139 / 1140	L-MAD	-	-	1139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Estiramento C-O de alcoóis secundários
1125 – 1128	L	-	-	-	-	-	-	1125	-	-	-	-	-	Unidades de siringila / estiramento de C-O em álcool secundário
1040 – 1185	L	1121	1118	1061	1080 1119	1119	1049 1121	-	1111 1159	1118	-	-	-	Estiramento de C-O de alcoóis secundários e éteres alifáticos
1043 / 1044	C / H / L	-	-	-	1044	-	-	-	-	-	-	-	-	Estiramento C-O, C-C e C- OH
1030 – 1038	L	1034	1035	1037	-	1038	-	-	1030	1031	1030	1030	-	Deformação em C-H de anel aromático no plano e em C-O de alcoóis primários
966 – 990	L	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	967	Deformação fora do plano em –HC=CH-
930	C / H	-	-	-	-	930	-	-	-	-	-	-	-	Ligação glicosídica
910 – 925	L	-	912	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Deformação fora do plano C- H em anel aromático
815 – 915	L	818 862	829 880 893 912	824 872 887	871 890	864 894	837 847 881 893	-	-	-	-	-	-	Deformação C-H aromático

TABELA 8 –BANDAS FTIR PARA OS EXTRATOS DE LIGNINA DE MADEIRA, RESÍDUOS AGRÍCOLAS E VALORES RELATADOS NA LITERATURA
(conclusão)

Faixa de onda (cm ⁻¹)	Polímero	Madeiras			Resíduos Agrícolas			Valores relatados na literatura						Atribuição
		BA	PE	PI	BC	CS	CT	1	2	3	4	5	6	
850 – 858	L	-	850 858	-	-	-	-	-	-	853	-	-	-	Deformação C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacila
843 – 845	L	-	843	845	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Vibração C-H aromático fora do plano
830 – 835	L	-	833	-	835	833	830	833	830	-	-	-	-	Deformação C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de unidades siringila
817 - 830	L	818	828	824	823	822	823							Deformação C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacila

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: C - (celulose); H - (hemicelulose); L - (lignina); L-MAD - (lignina de madeira); L-GMN - (lignina de gramíneas);
BA - (Bracatinga); PE - (Peroba); PI - (Pinus);
BC - (Bagaço de cana-de-açúcar); CS - (casca de soja); CT - (casca de trigo);
1 - Lignina Pepper de bagaço de cana-de-açúcar (Marabezi, 2009);
2 – Lignina organossolve de madeiras (Santos et al., 2015);
3 – Lignina organossolve de *Eucalyptus* (Wang et al., 2017);
4 – Lignina dioxano / HCl (Quinelato, 2016);
5 – Lignina etanol (Quinelato, 2016);
6 – Lignina álcali NaOH(Quinelato, 2016).

Conforme a interpretação dos espectros (Tabela 08) pode-se verificar que algumas bandas (regiões do espectro) foram comuns a todos os extratos, tanto os de madeira como os de resíduos agrícolas. Os picos presentes na região entre 2840 - 2937 cm^{-1} representam alongamentos nas ligações C-H em grupos CH_2 e CH_3 , e entre 1705 - 1738 cm^{-1} ocorrem devido a estiramentos de C=O em cetonas não conjugadas, carbonilas e ésteres.

As bandas na região de 1500 - 1515 cm^{-1} são atribuídas às vibrações do esqueleto aromático, e deformações assimétricas C-H em grupos metílicos são evidenciadas por meio das bandas na região entre 1445 - 1470 cm^{-1} . Já as bandas na região de 1040 - 1185 cm^{-1} são características de estiramentos de C-O em alcoóis secundários e éteres alifáticos, enquanto que deformações C-H em anéis aromáticos são atribuídos às bandas entre 815 - 915 cm^{-1} .

Todos os extratos apresentaram deformações C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades guaiacila na região 817 - 830 cm^{-1} .

Os extratos de madeira dura BA e PE apresentaram picos em 1658 e 1678 cm^{-1} , respectivamente, que são característicos de ligninas de madeiras e ocorrem devido a estiramentos C=O em cetonas conjugadas. Já os extratos BC, CS e CT apresentaram picos característicos a ligninas de gramíneas em 1631, 1656 e 1656 cm^{-1} , que são atribuídos a estiramentos C=O em cetonas conjugadas *p*-substituídas. Apenas os extratos PE e BC apresentaram picos na região entre 1593 - 1605 cm^{-1} devido às vibrações do esqueleto aromático influenciado por C=O.

Os picos na região entre 1420 – 1434 cm^{-1} que ocorrem devido às vibrações dos anéis aromáticos e deformações C-H no plano não foram evidenciados nos extratos de BA e CS. A amostra BA foi a única que apresentou deformação angular OH no plano atribuído ao pico 1427 cm^{-1} , e o extrato PE gerou pico em 1366 cm^{-1} devido ao estiramento C-H em grupos metílicos e fenólicos.

Tanto os extratos BA e PE (1327 e 1328 cm^{-1}), como o BC (1328 cm^{-1}) possuem estiramentos C-O em anel siríngico. Apenas os extratos de madeiras geraram picos para ligninas na região de 1265 - 1275 cm^{-1} , que podem ser atribuídos às vibrações de anéis guaiacílicos influenciados por C=O.

Estiramentos do tipo C-C, C-O e C=O foram evidenciados nos extratos BA, PE, CS e CT, enquanto que somente o BC apresentou estiramento C=O de ésteres conjugados. O pico 1139 cm^{-1} presente no espectro do PE indica a presença de alongamentos C-O de alcoóis secundários, bastante característicos para ligninas de

madeira. O extrato BC gerou um pico de 1044 cm^{-1} que deve ocorrer por estiramento C-O, C-C e C-OH.

Os picos 1034 , 1035 , 1037 e 1038 cm^{-1} presentes nos extratos BA, PE, PI e CS, respectivamente, podem ser atribuídos às deformações em C-H de anéis aromáticos no plano e em C-O de alcoóis primários. Os picos 843 e 845 cm^{-1} (PE e PI, respectivamente) ocorrem devido às vibrações C-H de anel aromático fora do plano. Por fim as bandas das amostras PE, BC, CS e CT na região entre $830 - 835\text{ cm}^{-1}$ sugerem deformações C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de unidades siringila.

Na Tabela 08 no item 1 estão listados os picos referentes à lignina Pepper de bagaço de cana-de-açúcar empregado como padrão por Marabezi (2009) no desenvolvimento de novos métodos analíticos para caracterização de lignina de palha e bagaço de cana-de-açúcar obtidas por isolamento Klason. É possível visualizar bandas nas mesmas regiões das produzidas pelos extratos de lignina deste trabalho. Na lignina BC são identificadas bandas em regiões distintas dos demais extratos, e que também estão presentes na lignina Pepper, respectivamente: $1631 / 1639\text{ cm}^{-1}$ (estiramento de C=O de cetonas conjugadas *p*-substituídas que são características em ligninas de gramíneas), $1604 / 1602\text{ cm}^{-1}$ (vibração do esqueleto aromático influenciada por C=O) e $835 / 833\text{ cm}^{-1}$ (deformação C-H fora do plano nas posições 2, 5 e 6 de unidades siringila).

As ligninas de madeira de *Corymbia citriodora* e de três espécies de *Eucalyptus* (CE) obtidas pelo método organossolve (etanol/água) por Santos e colaboradores (2015) apresentaram bandas nas mesmas regiões, que são características de ligninas, conforme o item 2 da Tabela 8. Estas bandas também estão presentes nos espectros dos extratos de madeiras e de resíduos agrícolas deste trabalho. O pico 1328 cm^{-1} presente para as ligninas CE também pôde ser visualizado nas amostras BA, PE e BC e está relacionado à vibração de anéis siringila e guaiacila condensados, e o pico 1271 cm^{-1} , gerado pela vibração do anel guaiacílico influenciado por ligação C=O, foi identificado tanto para as ligninas CE como para as ligninas de madeiras (BA, PE e PI) deste trabalho. Já o pico 1030 cm^{-1} , esteve presente nas amostras de lignina CE, de madeiras (BA, PE e PI) e de resíduo agrícola BC, e ocorre devido às deformações de ligações de C-H no plano, de C-O de alcoóis secundários e estiramento de C-H não-conjugado.

Em estudo realizado por Wang e coautores (2017) foram avaliados processos de pré-tratamento organossolve com 2-propanol/água a elevadas temperaturas para deslignificação de madeira de *Eucalyptus*. No item 3 da Tabela 8 estão os valores para os picos obtidos por estes autores. Tanto a lignina de *Eucalyptus* como as ligninas do presente trabalho apresentaram diversas bandas características para este polímero, porém algumas bandas não estão presentes para todas as ligninas, como o pico 1597 cm^{-1} da amostra de *Eucalyptus* que ocorre devido a vibrações do esqueleto aromático influenciado por ligações C=O, foi observado apenas nas ligninas PE e BC.

Quinelato (2016) comparou três métodos organossolve de extração de lignina de bagaço de cana-de-açúcar: dioxano/HCl, etanol e álcali (NaOH). Na Tabela 8 podem ser observadas as bandas, respectivamente, de cada um destes métodos nos itens 4, 5 e 6. O método álcali ocasionou maiores modificações estruturais da lignina, de modo que algumas das bandas presentes nas ligninas de dioxano/HCl e de etanol não foram evidenciadas para esta amostra, porém todas as extrações apresentaram bandas características para este polímero. As bandas presentes nos espectros das ligninas de Quinelato, e que correspondem àquelas presentes nas ligninas deste trabalho (BA, PE, PI, BC, CS e CT), estão compreendidas entre as regiões de 2840-2937, 1705-1738, 1593-1605, 1445-1470, 1365-1370, 1325-1330, 1165-1168 e $1030\text{-}1038\text{ cm}^{-1}$.

Com base na interpretação dos espectros dos extratos de lignina de madeira BA, PE e PI, e dos extratos de resíduos agrícolas BC, CS e CT, e na comparação com a literatura, é possível afirmar que o método de isolamento da lignina empregado neste trabalho foi efetivo em relação aos parâmetros qualitativos esperados para ligninas. Não foram realizadas análises quantitativas de FTIR para os extratos de lignina bruta.

Deste modo, consideram-se os extratos de lignina dioxano clorídrico obtidos como extratos de lignina bruta para fins deste trabalho.

4.2 PRODUÇÃO DE LACASE

Nesta seção são apresentados os resultados pertinentes às etapas A e B da produção de lacase por *Trametes* sp.

4.2.1 Produção de lacase: Etapa A

Os resultados da indução na síntese de lacase por extratos de lignina bruta estão subdivididos em dois grupos: madeiras e resíduos agrícolas.

4.2.1.1 Produção de lacase induzida pelo grupo madeiras

Neste trabalho foram empregados dois parâmetros para avaliar a produção da lacase pelo fungo *Trametes* sp., sendo a atividade enzimática dada por $U\ L^{-1}$ o parâmetro quantitativo da produção em determinado período, no qual são avaliadas todas as variáveis aplicadas ao cultivo, como: espécie e condições da cepa produtora, composição e forma do meio de cultivo, temperatura, tempo de incubação, agitação, iluminação, entre outros. O segundo parâmetro empregado foi o fator indutor, que avalia a influência do indutor aplicado ao cultivo na síntese enzimática, uma vez que o controle não recebe este componente. Este fator indutor é obtido pela divisão da atividade enzimática de um ensaio com aplicação de composto indutor (extratos de lignina bruta ou indutores químicos) dividido pela atividade enzimática do controle (cultivo em meio basal sem aplicação de indutores) em um mesmo período. Deste modo, o fator indutor refere-se ao potencial de indução de determinado indutor, ou ainda, da sinergia entre indutores para dadas condições experimentais.

O estudo da produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. na presença de extratos de ligninas de madeiras apresentou os maiores valores de atividade de lacase em $U\ L^{-1}$ no 16º dia de cultivo para todos os experimentos, inclusive para o controle, sendo que o extrato de PE obteve rendimento superior aos extratos de BA e PI (Gráfico 01).

Em relação ao fator indutor de cada espécie lignocelulósica ao longo do experimento, comparando-se com os resultados do controle SL para o mesmo período, pode-se afirmar que os extratos BA e PI mantiveram uma indução constante até o 12º dia de cultivo, apresentando redução no 16º dia. O extrato PE apresentou um efeito indutor crescente até o 12º dia, com uma leve redução do efeito indutor detectada no 16º dia (Gráfico 01).

No 6º dia de produção o extrato de lignina BA obteve os melhores resultados em comparação com os demais, atingindo $254\ U\ L^{-1}$, o que representa um

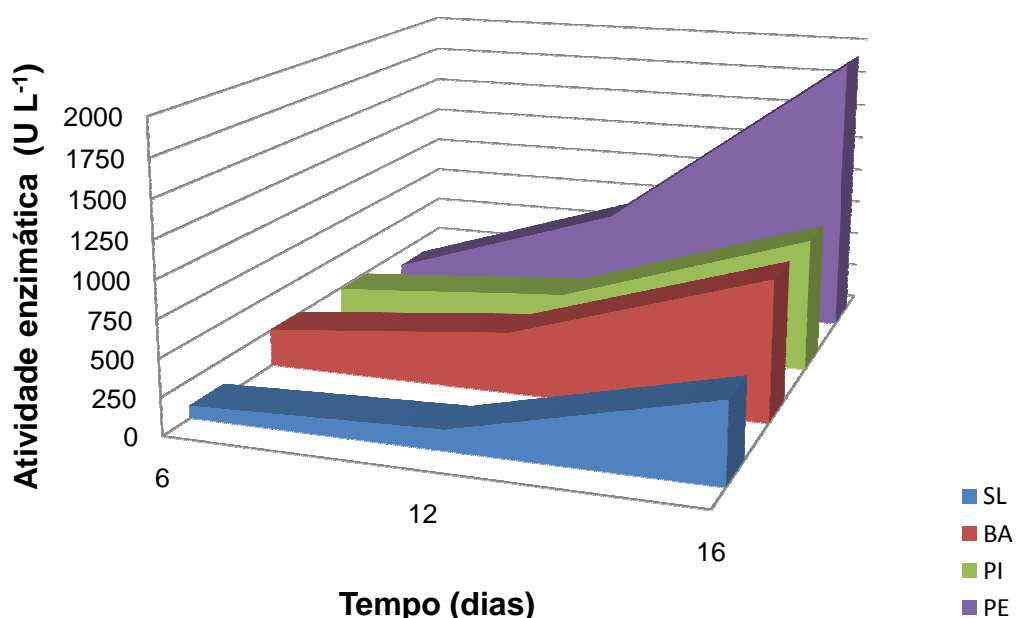
incremento de 3,06 vezes na atividade da lacase quando comparada com o controle SL que apresentou um valor de 83 U L^{-1} . Os extratos PE e PI obtiveram atividade enzimática de 128 U L^{-1} e 237 U L^{-1} , respectivamente.

No 12º dia de cultivo o extrato PE apresentou uma grande indução na produção de lacase com um valor de 670 U L^{-1} , ou seja, 4,90 vezes o valor do SL (137 U L^{-1}). Os extratos BA e PI apresentaram fatores indutores na ordem de 3,01 e 2,64, com atividades de 413 U L^{-1} e 361 U L^{-1} , respectivamente.

Finalmente ao 16º foi possível observar uma indução do extrato PE na ordem de 3,61 em relação ao controle, atingindo uma atividade de 1922 U L^{-1} e os extratos BA e PI obtiveram rendimentos semelhantes entre si, com atividades de 939 U L^{-1} e 906 U L^{-1} , respectivamente

Diante do exposto pode-se afirmar que o extrato PE apresenta um melhor efeito indutor ao longo do cultivo, como observado no 12º e 16º dia, sendo os seus valores melhores em relação aos demais, tanto em U L^{-1} como em relação ao seu efeito indutor comparado ao SL.

GRÁFICO 01 - PRODUÇÃO DE LACASE COM LIGNINAS DO GRUPO MADEIRAS



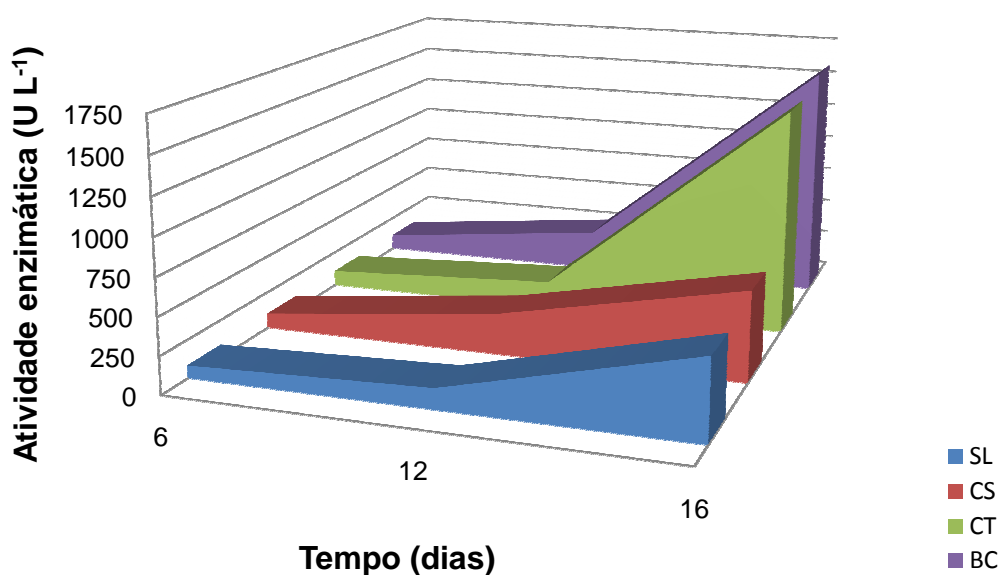
FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: SL: controle sem lignina, BA: bracatinga, PI: pinus e PE: peroba.

4.2.1.2 Produção de lacase induzida pelo grupo resíduos agrícolas

No Gráfico 02 pode ser observada a produção de lacase para o grupo resíduos agrícolas.

GRÁFICO 02 - PRODUÇÃO DE LACASE COM LIGNINAS DO GRUPO RESÍDUOS AGRÍCOLAS



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: SL: controle sem lignina, BC: bagaço de cana-de-açúcar, CS: casca de soja, CT: casca de trigo

No 6º dia de cultivo, todos os extratos (BC, CS e CT) apresentaram um fator indutor semelhante, sendo aproximadamente 1,25 vezes o valor do controle SL, que obteve 83 U L⁻¹.

No 12º dia os extratos BC e CS apresentaram o mesmo valor de atividade enzimática com 274 U L⁻¹, ou seja, o dobro da atividade obtida no controle SL, demonstrando um crescimento linear. Já o extrato CT manteve um fator indutor constante até o 12º dia, com um incremento de 1,35 na produção da enzima, atingindo um valor de 185 U L⁻¹ de atividade para a lacase.

Aos 16 dias de cultivo os extratos BC e CT obtiveram os melhores resultados com incrementos na ordem de 3,00 e 2,85, atingindo valores de atividade de 1593 U L⁻¹ e 1520 U L⁻¹, respectivamente.

Segundo Libardi Jr (2010) tanto as diferenças entre as espécies produtoras de lacase, bem como a natureza do material lignocelulósico, a solubilização e a liberação de substâncias podem afetar a forma de expressão destas enzimas.

Neste trabalho, a adição de extratos de lignina bruta (1g L^{-1}) ao meio de cultivo do fungo *Trametes* sp. estimulou a produção de lacase, sendo que aos 16 dias de cultivo as maiores taxas de atividade foram obtidas, com 1922 U L^{-1} para o extrato de peroba (grupo madeiras) e 1593 U L^{-1} para o extrato BC (grupo resíduos agrícolas). Estes valores demonstram a afinidade do fungo *Trametes* sp. pelos extratos de lignina empregados, e o seu poder de indução na síntese de lacase, variando conforme o tipo da lignina e o tempo de incubação.

Tinoco e colaboradores (2011) cultivaram o fungo *Pleurotus ostreatus* em diversas formulações de meio de cultivo líquido a 30°C , com agitação de 150 rpm por 60 h. Após este período selecionaram um dos experimentos, o qual a formulação do meio de cultivo apresentou maior atividade enzimática de lacase (1200 U L^{-1}), e aplicaram isoladamente: lignina solúvel alcalina com baixo teor de sulfonato (Sigma-Aldrich) em concentração de $0,5\text{ g L}^{-1}$, sulfato de cobre $0,5\text{ mmol L}^{-1}$, e um terceiro experimento contendo ambos os indutores. Os experimentos foram incubados nas mesmas condições anteriores por mais 36h, ou seja, 96h de incubação ao todo, e os fatores de indução obtidos foram de 3,75 para a lignina e de 4 para o cobre. Após este período a lignina não apresentou elevações na indução, enquanto que o cobre em 132 horas de cultivo obteve um incremento na indução de 5,83 vezes o valor do controle, ficando com 7000 U L^{-1} . Em 108 horas de cultivo o experimento contendo ambos os indutores apresentou a maior atividade para lacase, chegando a 12200 U L^{-1} , o que demonstra um efeito sinérgico entre os indutores.

Em comparação aos fatores de indução apresentados por Tinoco e colaboradores (2011), pode-se afirmar que foram obtidos resultados similares, em relação ao fator indutor, para alguns dos extratos de lignina, como o BA que apresentou um fator de indução de 3,06 no 6° dia, e o PE com 4,90 e 3,61, no 12° e 16° dias de incubação.

Alguns outros estudos com materiais lignocelulósicos foram realizados para o fungo *Trametes* sp., como o cultivo sólido em folhas de oliveira a 26°C , que atingiu valores de $276,62 \pm 25,67\text{ U g}^{-1}$ de substrato seco com umidade inicial de 80% e uma dimensão de partícula de 1,4-1,6 mm do substrato suplementado com extrato

de levedura 1% no 25º dia de cultivo (AYDINOĞLU; SARGIN, 2013). Ou ainda a suplementação de meio líquido pela aplicação de licor de milho (20 g L^{-1}) como fonte de nitrogênio, que resultou em um fator indutor de 1,96 em comparação ao controle, atingindo uma atividade de $633,3\text{ U L}^{-1}$ após um período de cultura de 5 dias a temperatura de 26°C com inóculo de *Trametes* sp. (WANG et al., 2014).

Xin e Geng (2011) realizaram o cultivo de *Trametes versicolor* em meio nutriente suplementado com resíduos hortícolas por 7 dias, a 30°C , com 85% de umidade inicial e aplicação dos indutores: etanol, ácido caféico, ácido siríngico, pirogalol, guaiacol, álcool veratrílico e sulfato de cobre. O maior valor para lacase foi de $8,6\text{ U g}^{-1}$ de substrato, com fator indutor de 2,8, utilizando como indutor álcool veratrílico.

Enquanto que Youshuang e colaboradores (2011) realizaram cultivo submerso com esta mesma espécie de *Trametes* em condições otimizadas com metodologia de superfície de resposta onde foram analisadas quatro variáveis quantitativas independentes, a concentração de: glicose, extrato de levedura, sulfato de cobre e o pH inicial do meio de cultivo. O maior valor para a lacase foi de 4213 U L^{-1} , com fator indutor de 3,00, que foi obtido no 7º dia de cultivo em pH 4,5, com a formulação do meio de cultivo contendo: glicose ($3,5\text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura (7 g L^{-1}) e CuSO_4 ($4,5\text{ mg L}^{-1}$).

Em comparação à produção de lacase por *Trametes* sp. e *T. versicolor* obtida pelos autores supracitados pode-se afirmar que os resultados apresentados neste trabalho foram satisfatórios em relação aos fatores de indução que variaram no tempo (6 a 16 dias) de 1,13 a 4,90, comparativamente aos resultados destes autores em períodos de cultivo de 5 a 7 dias, com fatores de 1,96 a 3,00.

A produção de lacase nos estudos realizados pelos autores mencionados e neste trabalho apresenta diferenças que podem ser justificadas por alguns fatores, tais como: a espécie e condições da cepa e suas individualidades frente à composição do meio de cultivo, e demais condições de incubação.

Os experimentos realizados com os extratos de lignina bruta obtiveram resultados satisfatórios quando comparados com outros indutores semelhantes empregados na literatura. Desta forma é possível afirmar que estes extratos apresentam potencial de indução na síntese de lacase pelo basidiomiceto fungo *Trametes* sp., nas condições experimentais empregadas neste trabalho.

4.2.1.3 Seleção dos extratos de lignina bruta para a etapa B

A Tabela 09 apresenta a ANOVA para a produção de lacase, com a adição de extratos de lignina bruta ao cultivo de *Trametes* sp. para o grupo madeiras ao 16º dia, que mostra que há diferenças significativas entre as médias, apresentando valor de $p < 0,05$, e de F calculado superior ao de F tabelado.

TABELA 09 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA PRODUÇÃO DE LACASE INDUZIDA PELA ADIÇÃO DE EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO MADEIRAS COM 16 DIAS DE CULTIVO

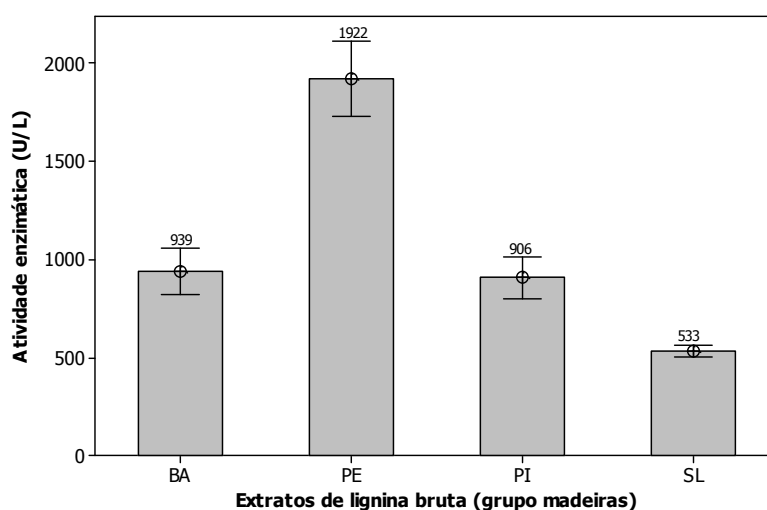
Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}	Valor p
Extratos de lignina bruta (grupo madeiras)	3	3173945	1057982	413,69	4,07	0,000
Erro	8	20459	2557	---	---	---
Total	11	3194404	---	---	---	---

R²: 99,12%

FONTE: O autor (2016).

Por meio do emprego do teste de Tukey, com 95% de confiança, pode se afirmar que todos os extratos de lignina bruta possuem diferenças significativas de média em relação ao controle SL. Os extratos BA e PI não apresentaram diferenças significativas entre suas médias, e o grupo PE apresentou média diferente e superior a todos os grupos (BA, PI e SL) (Gráfico 03).

GRÁFICO 03 - PRODUÇÃO DE LACASE COM ADIÇÃO DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO MADEIRAS COM 16 DIAS DE CULTIVO



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: BA: bracatinga / PE: peroba
PI: pinus / SL: controle sem lignina

Diante dos resultados obtidos para o grupo madeiras, o extrato de lignina bruta PE foi selecionado para a etapa seguinte da produção de lacase.

A Tabela 10 apresenta a ANOVA para a produção de lacase, com a adição de extratos de lignina bruta ao cultivo de *Trametes* sp. para o grupo resíduos agrícolas ao 16º dia, que mostra que há diferenças significativas entre as médias, apresentando valor de $p < 0,05$, e de F calculado superior ao de F tabelado.

TABELA 10 - ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA PRODUÇÃO DE LACASE INDUZIDA PELA ADIÇÃO DE EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO RESÍDUOS AGRÍCOLAS COM 16 DIAS DE CULTIVO

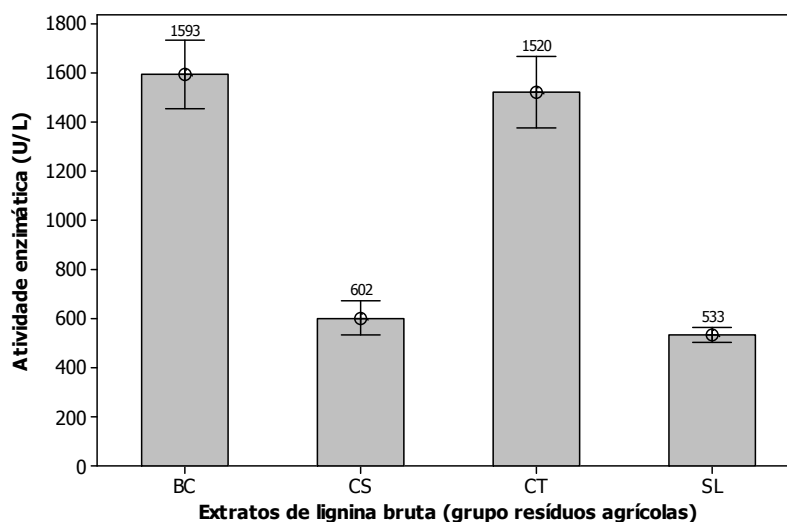
Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}	Valor p
Extratos de lignina bruta (grupo resíduos agrícolas)	3	2947375	982458	520,42	4,07	0,000
Erro	8	15103	1888	---	---	---
Total	11	2962478	---	---	---	---

R²: 99,30%

FONTE: O autor (2016).

Por meio do emprego do teste de Tukey, com 95% de confiança, pode se afirmar que apenas os extratos BC e CT apresentaram diferenças significativas de média em relação ao controle SL. O extrato CS não possui diferença significativa com o SL. Entretanto, os extratos BC e CT possuem médias semelhantes entre si, ou seja, não apresentam diferenças significativas entre as suas médias (Gráfico 04).

GRÁFICO 04 - PRODUÇÃO DE LACASE COM ADIÇÃO DOS EXTRATOS DE LIGNINA BRUTA DO GRUPO RESÍDUOS AGRÍCOLAS COM 16 DIAS DE CULTIVO



FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: BC: bagaço de cana-de-açúcar
CS: casca de soja / CT: casca de trigo / SL: controle sem lignina

Neste trabalho, optou-se pelo emprego do extrato de lignina bruta BC para a etapa seguinte da otimização da produção de lacase, devido ao seu melhor desempenho também no 12º dia de cultivo em relação ao extrato de lignina bruta CT, conforme Gráfico 02 .

4.2.2 Otimização da produção de lacase: Etapa B

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos na otimização da produção de lacase por meio da execução de um delineamento de experimentos fatorial fracionário⁵⁻² (DOE) realizado com os indutores: sulfato de cobre, siringol, dioxano e os extratos de lignina bruta de peroba e de bagaço de cana-de-açúcar.

A adequação do modelo DOE para a otimização da produção de lacase pode ser verificada pela ANOVA apresentada na Tabela 11, que obteve um R^2 igual a 99,53%, com valores de $p < 0,05$ e de F calculado superior ao de F tabelado, o que demonstra que o modelo é significativo, e portanto, válido.

TABELA 11 – ANOVA DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática ajustada	Média quadrática ajustada	F_{calc}	F_{tab}	Valor p
Efeitos principais	5	12303199744	2460639949	1921,02	2,53	0,000
Interações entre dois fatores	10	360140589	36014059	28,12	2,16	0,000
Resíduos	32	40988785	1280900	---	---	---
Erro puro	32	40988785	1280900	---	---	---
Total	47	---	---	---	---	---

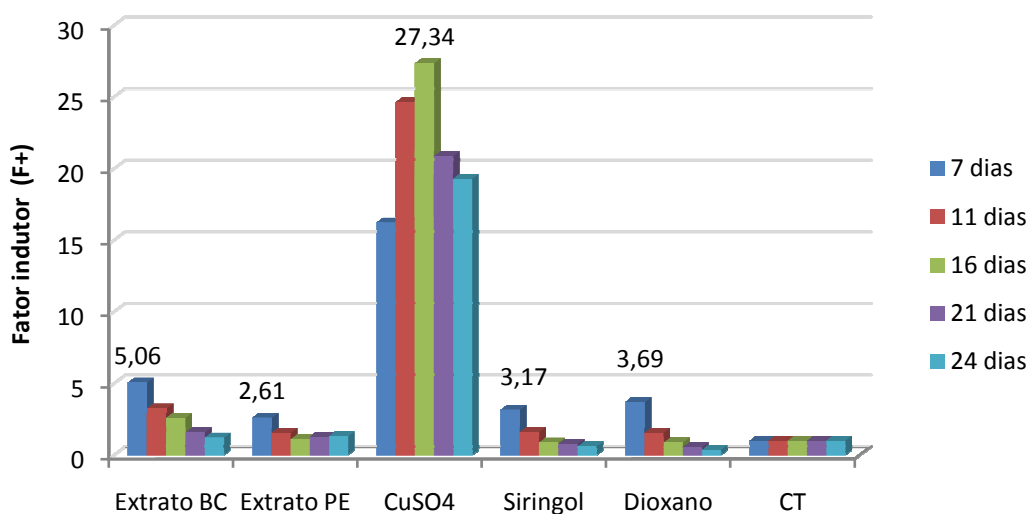
R^2 : 99,53%

FONTE: O autor (2017).

4.2.2.1 Efeitos principais dos fatores indutores

Conforme o Gráfico 05, que apresenta os fatores indutores ($F+$) individuais na síntese de lacase por *Trametes* sp. ao longo do tempo, pode-se observar que os indutores dioxano ($F+$: 3,69), siringol ($F+$: 3,17) e os extratos brutos de lignina BC ($F+$: 5,06) e PE ($F+$: 2,61) apresentaram maior potencial indutor ao 7º dia de cultivo, quando comparado ao controle (CT), e o sulfato de cobre obteve seu melhor desempenho no 16º dia de incubação com um fator 27,34 vezes superior ao controle.

GRÁFICO 05 – FATOR INDUTOR DE LACASE OBTIDO PELA ADIÇÃO INDIVIDUALIZADA DOS INDUTORES AO LONGO DE 24 DIAS DE CULTIVO



FONTE: O autor (2017).

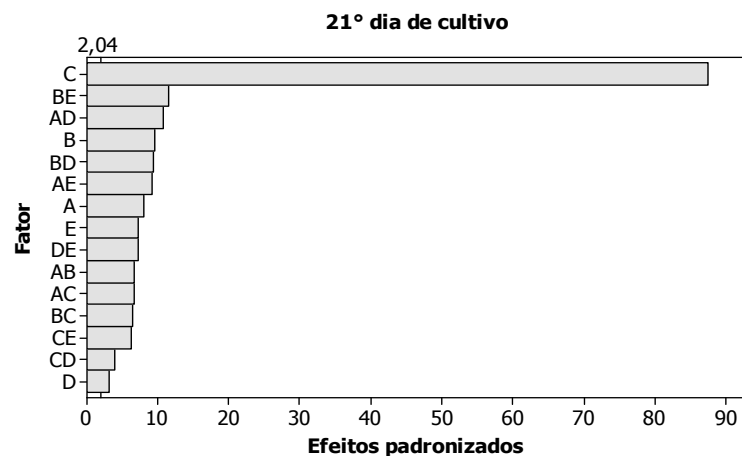
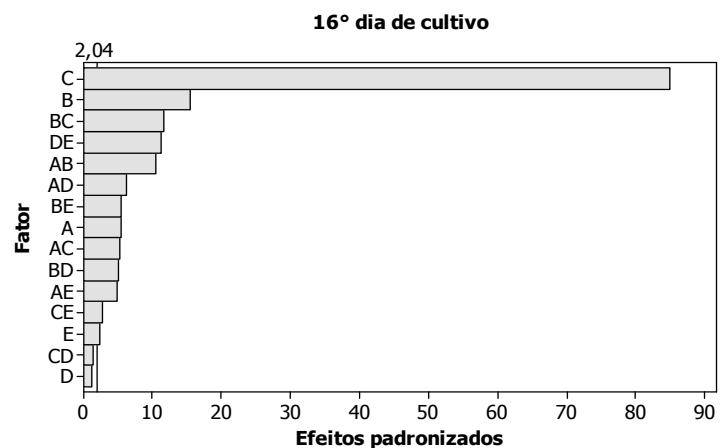
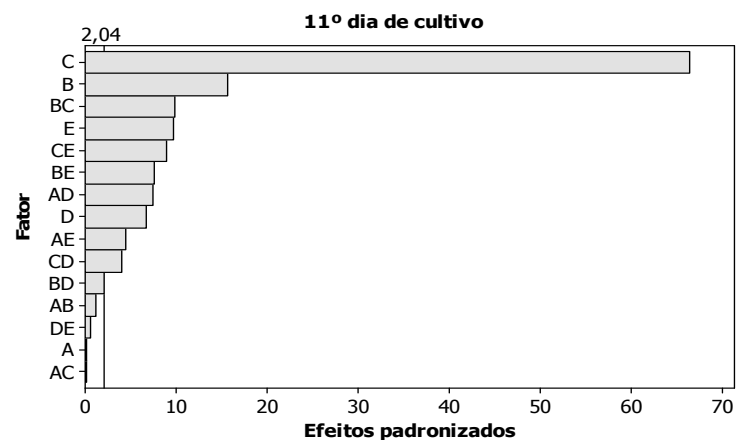
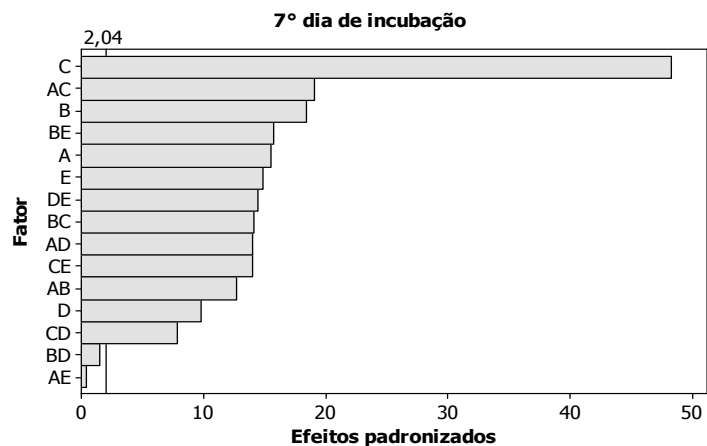
LEGENDA: BC: bagaço de cana-de-açúcar
PE: peroba / CT: controle sem indutores

Em relação à atividade enzimática de lacase, dada em $U L^{-1}$, pode-se observar que tanto os extratos BC e PE, como o sulfato de cobre e o controle CT mantiveram um crescimento constante ao longo do experimento, enquanto que o siringol manteve a atividade de lacase relativamente constante até o 16º dia de cultivo, apresentando valores superiores apenas no 21º e 24º dias de cultivo. Já o dioxano apresentou uma pequena queda na atividade ao 11º dia de cultivo, e manteve-se sem alterações significativas até o final do experimento.

4.2.2.2 Efeito da interação dos fatores indutores: 7º, 11º, 16º e 21º dia de cultivo

Nos diagramas de Pareto (Gráfico 06) é possível visualizar as interações entre dois fatores mais significativas para a produção de lacase ao 7º, 11º, 16º e 21º dias de cultivo.

GRÁFICO 06 - DIAGRAMA DE PARETO DAS INTERAÇÕES ENTRE DOIS FATORES NA PRODUÇÃO DE LACASE: 7°, 11°, 16° E 21° DIAS DE CULTIVO



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A: Extrato PE / B: Extrato BC / C: CuSO_4 / D: Dioxano / E: Siringol

No 7º dia apenas as interações entre o extrato BC e o dioxano (BD), e entre o extrato PE e o siríngol (AE) não influenciaram significativamente a produção de lacase. No 11º dia de cultivo foram observadas alterações nos efeitos de indução, sendo que as interações BD, AB, DE e AC não foram significativas para a produção de lacase no período.

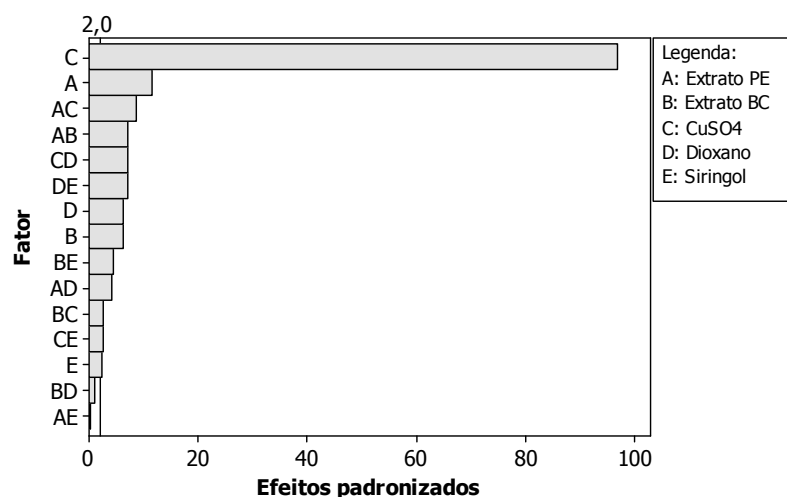
No 16º dia de cultivo apenas a interação entre o sulfato de cobre e o dioxano (CD) não foi significativa para a síntese de lacase. Já no 21º dia de incubação todas as interações foram significativas.

4.2.2.3 Efeitos das interações dos fatores indutores no 24º dia de cultivo

No 24º dia de cultivo foi encerrada a incubação sendo determinados os efeitos de interação dos fatores para a produção de lacase por *Trametes* sp., neste trabalho.

No último dia de cultivo (24º), assim como no 7º dia de incubação, apenas as interações AE (PE e siríngol) e BD (BC e dioxano) não foram significativas para a produção de lacase. No diagrama de Pareto (Gráfico 07) é possível mensurar a significância das interações entre dois fatores.

GRÁFICO 07 – INTERAÇÕES ENTRE DOIS FATORES NA PRODUÇÃO DE LACASE: 24º DIA

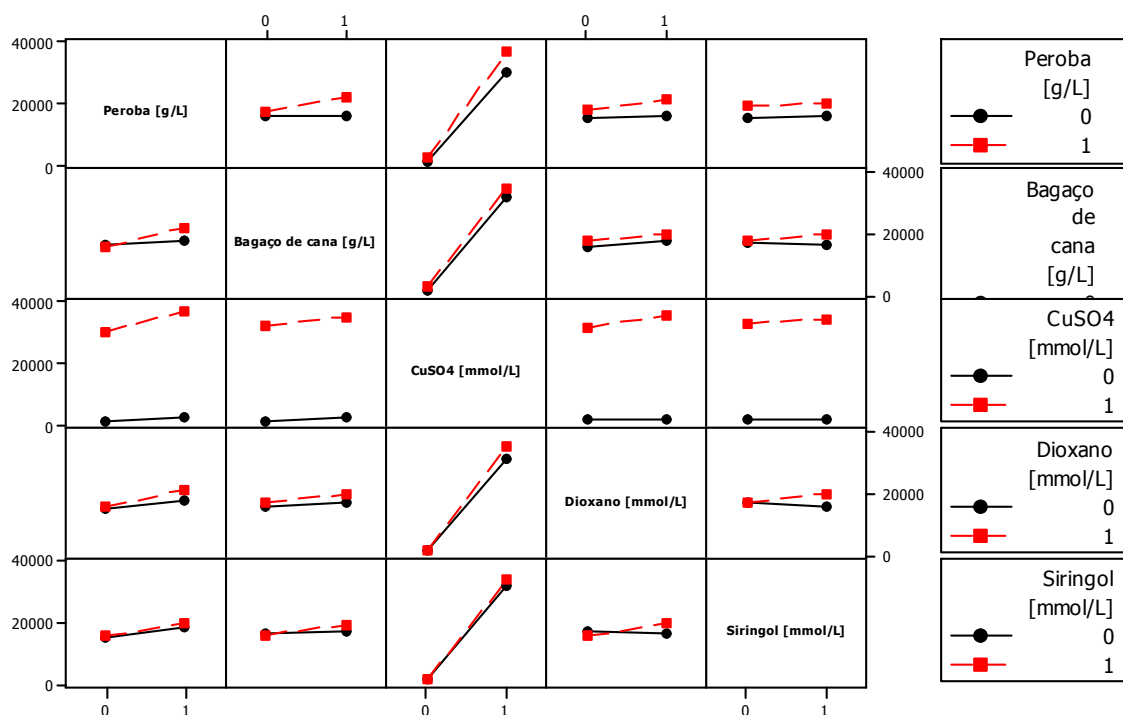


FONTE: O autor (2017).

As interações entre dois fatores também podem ser observadas no Gráfico 08, no qual o paralelismo entre os fatores indica que a interação não é significativa. Como já demonstrado no diagrama de Pareto, as interações AE (PE e

siringol) e BD (BC e dioxano) não são estatisticamente significativas para a síntese de lacase aos 24 dias de cultivo.

GRÁFICO 08 - INTERAÇÕES ENTRE DOIS FATORES: 24 DIAS DE CULTIVO

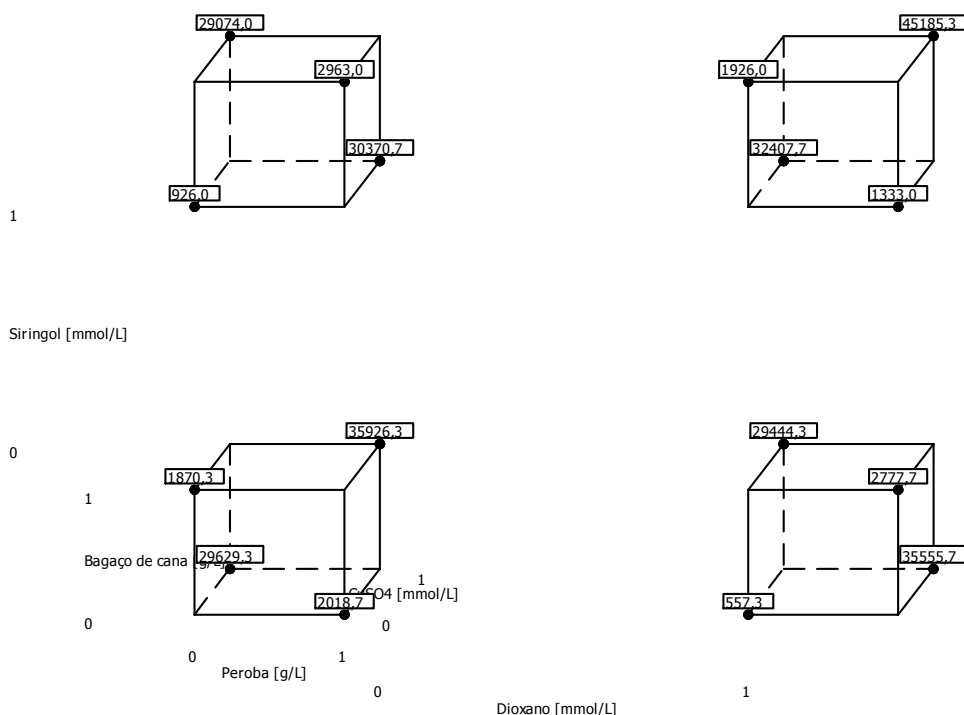


FONTE: O autor (2017).

No Gráfico 09 estão representadas as interações entre todos os cinco fatores aplicados para a produção de lacase. Esta representação gráfica apresenta os melhores rendimentos da produção enzimática ao 24º dia de cultivo. É possível observar que o maior valor obtido foi de 45.185 U L^{-1} para o experimento 16 que contém os cinco fatores associados. Sequencialmente, os dois melhores conjuntos foram os experimentos 8 (BC, PE e CuSO_4) e o 14 (PE, CuSO_4 e dioxano), com 35.926 e 35.556 U L^{-1} , respectivamente.

Durante todo o período deste estudo, o experimento 16 (BC, PE, CuSO_4 , dioxano e siringol) foi o que apresentou os maiores valores de atividade para lacase (U L^{-1}), conforme a Tabela 12.

GRÁFICO 09 – REPRESENTAÇÃO EM CUBO DA INTERAÇÃO ENTRE OS CINCO FATORES



FONTE: O autor (2017).

Em relação aos demais valores de interesse, pode-se dizer que no 7º dia os experimentos 7 (BC, CuSO₄ e siringol) e 8 (BC, PE e CuSO₄) obtiveram rendimentos superiores aos demais, sendo 6.370 e 6.704 U L⁻¹, respectivamente. Já no 11º dia, apenas o experimento 7 manteve-se com valores acima da média apresentando 17.778 U L⁻¹. O 16º dia apresentou um padrão semelhante ao do 7º dia, com valores superiores para os experimentos 7 e 8, com 21.481 e 24.815 U L⁻¹ (Tabela 12).

No 21º dia o destaque foi novamente para os experimentos 7 e 8 com 32.593 U L⁻¹ e 30370 U L⁻¹, respectivamente, e para o experimento 14 (PE, CuSO₄ e dioxano) com 30.185 U L⁻¹. Enquanto que no 24º e último dia de incubação o experimento 8 produziu uma atividade de 35.926 U L⁻¹, e o 14 o máximo de 35.556 U L⁻¹ (Tabela 12).

Em relação ao fator de indução (F+) foram observadas variações ao longo do cultivo, sendo representada na maioria dos experimentos por uma redução com o tempo de cultivo, conforme é possível visualizar na Tabela 12. O maior valor para o fator de indução foi observado no 7º dia de incubação para o experimento 16 (que contém todos os indutores) com um F+: 83,23.

TABELA 12 – DADOS DO FATORIAL FRACIONÁRIO⁵⁻² E DA PRODUÇÃO DE LACASE POR *Trametes* sp. NA ETAPA B

		7° dia			11° dia			16° dia			21° dia			24° dia		
Experimento		U L ⁻¹	DP (±)	F+	U L ⁻¹	DP (±)	F+	U L ⁻¹	DP (±)	F+	U L ⁻¹	DP (±)	F+	U L ⁻¹	DP (±)	F+
1	SI	565	21	3,17	558	30,7	1,61	550	30,6	0,87	843	14	0,78	926	64,2	0,60
2	PE	465	43,2	2,61	539	3,2	1,56	693	22,5	1,10	1370	84,5	1,28	2019	64,2	1,31
3	BC	900	29,4	5,06	1130	96,2	3,27	1630	32,1	2,59	1704	84,9	1,59	1870	84,9	1,22
4	BC / PE / SI	639	57,7	3,59	1185	55,6	3,42	1296	84,9	2,06	2519	139,8	2,35	2963	315,9	1,93
5	SC	2889	147	16,23	8519	320,8	24,62	17222	320,8	27,34	22407	641,6	20,86	29630	1398,1	19,28
6	PE / SC / SI	3574	32,1	20,08	9444	320,8	27,29	13519	0	21,46	20000	2421,6	18,62	30370	1398,1	19,76
7	BC / SC / SI	6370	178,6	35,79	17778	848,6	51,38	21481	848,6	34,10	32593	1398,1	30,35	29074	1283	18,92
8	BC / PE / SC	6704	231,3	37,66	11481	962,3	33,18	24815	2103,3	39,39	30370	641,5	28,28	35926	641,5	23,37
9	DX	657	42,4	3,69	531	19,2	1,53	552	62,6	0,88	594	11,1	0,55	557	17	0,36
10	PE / DX / SI	380	17	2,13	719	37	2,08	833	32,1	1,32	1222	192,5	1,14	1333	0	0,87
11	BC / DX / SI	1593	84,9	8,95	2167	178,6	6,26	1444	160,4	2,29	1907	64,2	1,78	1926	64,2	1,25
12	BC / PE / DX	757	22,5	4,25	1926	32,1	5,57	1500	84,9	2,38	1593	32,1	1,48	2778	55,6	1,81
13	SC / DX / SI	4537	84,9	25,49	12222	555,6	35,32	17407	1469,9	27,63	27407	1697,3	25,52	32407	1283	21,08
14	PE / SC / DX	5407	84,9	30,38	11852	848,6	34,25	16481	848,6	26,16	30185	1697,3	28,11	35556	1111,1	23,13
15	BC / SC / DX	2185	139,8	12,28	12593	1283	36,40	15370	320,8	24,40	18519	848,6	17,24	29444	3379,3	19,16
16	BC / PE / SC DX / SI	14815	1398,1	83,23	18148	1156,5	52,45	25741	555,6	40,86	37593	1283	35,00	45185	320,8	29,40
CT	-----	178	9,6	-----	346	11,6	-----	630	32,1	-----	1074	32,1	-----	1537	84,9	-----

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: DP: desvio padrão, BC: Extrato de bagaço de cana-de-açúcar, PE: Extrato de peroba, DX: dioxano, SI: siringol, SC: CuSO₄

CT: controle sem indutores

F+: fator de indutor (em relação ao CT)

No 11º dia o experimento contendo extrato de BC, CuSO_4 e siringol atingiu um F+: 51,38 que foi bastante semelhante ao do experimento 16 (F+: 52,45). No 16º dia de cultivo o experimento 16 obteve um F+: 40,86 e o experimento 8 (extratos de BC e PE, e CuSO_4) um F+: 39,39. No 21º dia o experimento 16 obteve um F+: 35, e no 24º dia um F+: 29,40.

Os dados na Tabela 12 permitem afirmar que os fatores de indução foram maiores no início do experimento para quase todas as interações, sofrendo redução dos seus valores ao longo do cultivo. Entretanto, a atividade de lacase foi crescente para os cultivos, inclusive para o controle sem adição de indutores, fato já esperado, devido ao crescimento micelial em todos os experimentos.

Zhu, Bao e Huang (2016) otimizaram a produção de lacase do fungo *Pleurotus ostreatus* por meio da variação dos tipos e das concentrações de fontes de carbono e nitrogênio, de compostos fenólicos e de íons metálicos no meio de cultivo. Dentre todas as substâncias testadas, as que apresentaram maior poder de indução de lacase foi o extrato de levedura a 1%, e especialmente o cobre que em concentração de 1 mmol L^{-1} obteve uma atividade de $412,50 \pm 46,24 \text{ U mL}^{-1}$ em 8 dias de cultivo. A interação entre estes dois fatores foi positiva atingindo $8.533,33 \text{ U mL}^{-1}$ no 13º dia de cultivo em concentrações de 2 mmol L^{-1} de Cu^+ e 1% de extrato de levedura. Tanto para a concentração de 2 mmol L^{-1} como para 1 mmol L^{-1} de cobre o *P. ostreatus* apresentou rendimentos superiores aos obtidos pelo *Trametes sp.* neste trabalho.

Thiribhuvanamala e colaboradores (2017) utilizaram diversos resíduos agrícolas como substrato para o cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju*, sendo um deles o bagaço de cana-de-açúcar com 70% de umidade a temperatura de 30°C . A maior atividade de lacase foi observada no 28º dia de incubação com $0,56 \text{ U mL}^{-1}$, resultado este inferior aos obtidos no presente trabalho, que foram de: 45.185 U L^{-1} quando aplicados os cinco indutores, e 1.870 U L^{-1} quando suplementado apenas com o extrato de lignina bruta BC. A diferença nas atividades obtidas pode ser explicada devido às diferenças de espécie dos fungos empregados, e também pelo uso dos indutores, e da lignina bruta do bagaço de cana-de-açúcar ao invés do substrato, o que aumenta a disponibilidade deste polímero para o fungo.

Vasina e colaboradores (2015) realizaram a indução na produção de proteínas extracelulares de *Trametes hirsuta* pela aplicação de 1 mmol L^{-1} de CuSO_4 ao meio basal de glicose-peptona (GP), o que resultou em uma atividade de

aproximadamente 9 U mL^{-1} de lacase no 8º dia de cultivo, com fator de indução igual a 8. No 7º dia, do presente estudo, o experimento contendo somente o cobre (1 mmol L^{-1}) como indutor obteve um fator de indução de 16,23, ou seja, o dobro do efeito obtido para o fungo *Trametes hirsuta* nestas condições.

Adekunle, Guo e Liu (2017) cultivaram o fungo *Trametes versicolor* em caldo basal, com e sem a adição de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de padrão de lignina (Sigma-Aldrich), por um período de 7 dias a uma temperatura de 26°C . O experimento que continha lignina apresentou um fator de indução de 3,69 e atingiu uma atividade de lacase de $1.213,93 \text{ U L}^{-1}$.

No presente experimento o fungo *Trametes* sp. obteve pela suplementação de 1 g L^{-1} dos extratos brutos de lignina BC e PE, fatores de indução de 5,06 e 2,61, respectivamente ao 7º dia de cultivo. Os resultados entre o presente estudo e o dos autores supracitados foram bastante semelhantes, fato este que pode ser justificado por se tratar da espécie *Trametes* em ambos os experimentos, bem como pelo tipo e concentração do indutor empregado.

Bírhánli e Yeşilada (2017) otimizaram a produção de lacase fúngica por *Trametes versicolor* pela aplicação aleatória de cobre, ABTS, seringaldazina, guaiacol e 2,5-xilidina em meio de cultivo basal incubado a temperatura de 30°C . A melhor interação ocorreu entre $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^+ e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de 2,5-xilidina, que em 7 dias de cultivo obteve a atividade máxima de $33,61 \text{ U mL}^{-1}$. Por conseguinte a interação entre $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^+ e $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ de ABTS, no 4º dia de cultivo, atingiu sua atividade máxima de lacase com $26,49 \text{ U mL}^{-1}$.

Comparativamente a melhor interação obtida no presente trabalho no período de 7 dias foi pela aplicação dos cinco indutores (BC, PE, CuSO_4 , dioxano e siringol) com 14.815 U L^{-1} , seguida da interação (BC, PE e CuSO_4) com 6.704 U L^{-1} , resultados estes inferiores aos obtidos pelos autores Bírhánli e Yeşilada (2017). Já em 24 dias a atividade enzimática foi superior, atingindo 45.185 U L^{-1} de lacase. Diferenças entre as espécies de fungos, bem como as interações entre os indutores, e a composição do meio basal podem influenciar na síntese de lacase ao longo do período de cultivo.

Na indução da síntese de lacase pelo fungo *Agaricus blazei*, realizada por Valle e coautores (2015) foram empregadas diferentes concentrações de nitrogênio, cobre, pirogalol, álcool veratrílico, xilidina, vanilina, guaiacol e etanol em um experimento com 21 dias de cultivo a temperatura de 28°C . A melhor interação foi

obtida pela aplicação de $2,8 \text{ g L}^{-1}$ de nitrogênio e $150 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de cobre ao meio de cultivo basal que atingiu $43,8 \text{ U mL}^{-1}$, sendo que a presença do cobre reduziu a produção de biomassa. Os valores encontrados por estes autores são bastante semelhantes aos obtidos neste trabalho, porém os indutores e a espécie do fungo empregado são bastante diferenciados.

Em comparação aos experimentos apresentados na literatura, pode-se afirmar que os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios. O principal fator indutor, como já era esperado, foi o cobre que é um dos componentes de formação da lacase, portanto a sua adição ao meio de cultivo induz a síntese desta enzima por diversos fungos (BİRHANLI; YEŞİLADA, 2017). Os extratos de lignina bruta de bagaço de cana-de-açúcar e de peroba obtiveram rendimentos semelhantes aos relatados na literatura quando da suplementação com padrão de lignina pura.

As lacases possuem afinidade com o siringol, que é um metoxifenol produzido pela pirólise da lignina de madeira. Este composto é usualmente empregado como substrato na análise da atividade enzimática da lacase, ou ainda como mediador desta enzima na oxidação de alguns compostos, como relatado por (BARRASA et al., 2014; PISTONE et al., 2016; SINGH et al., 2017). Neste trabalho o siringol, que foi suplementado ao meio de cultivo para avaliar o seu poder de indução na síntese da lacase, apresentou interações significativas no 24º dia de cultivo com o dioxano, com o extrato BC e com o CuSO_4 , deste modo pode-se afirmar que o siringol surtiu um efeito positivo na produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp.

Em relação ao solvente apolar aprótico dioxano, que é um éster cíclico saturado, não foram encontrados relatos na literatura sobre o seu emprego no cultivo de basidiomicetos com a finalidade de induzir a produção de enzimas lignocelulolíticas. Em relação às lacases, o dioxano é normalmente utilizado como cossolvente em tampões para oxidação de compostos aromáticos com o emprego de mediadores de lacase, visto que esta condição pode ser benéfica para a biotransformação de substratos recalcitrantes, como descrito nos estudos realizados por D'Alfonso e colaboradores (2014) e Ferrario e coautores (2015).

O dioxano apresentou seu melhor desempenho no 7º dia de cultivo com um fator de indução de 3,69, valor este que foi inferior apenas em relação aos valores apresentados pelo CuSO_4 (16,23) e pelo extrato BC (5,06), individualmente. No 24º dia de incubação este indutor apresentou interações entre dois fatores com o

siringol (DE), com o extrato PE (AD) e com o CuSO_4 (CD). Dentre os valores máximos de atividade para lacase obtidos, o dioxano está presente no valor ótimo de 45.185 U L^{-1} (emprego dos cinco indutores), e na interação (extrato PE, CuSO_4 e dioxano) com 35.556 U L^{-1} . Portanto, pode-se afirmar que o dioxano possui capacidade de induzir a síntese de lacases, e também pode sofrer sinergia com outros indutores.

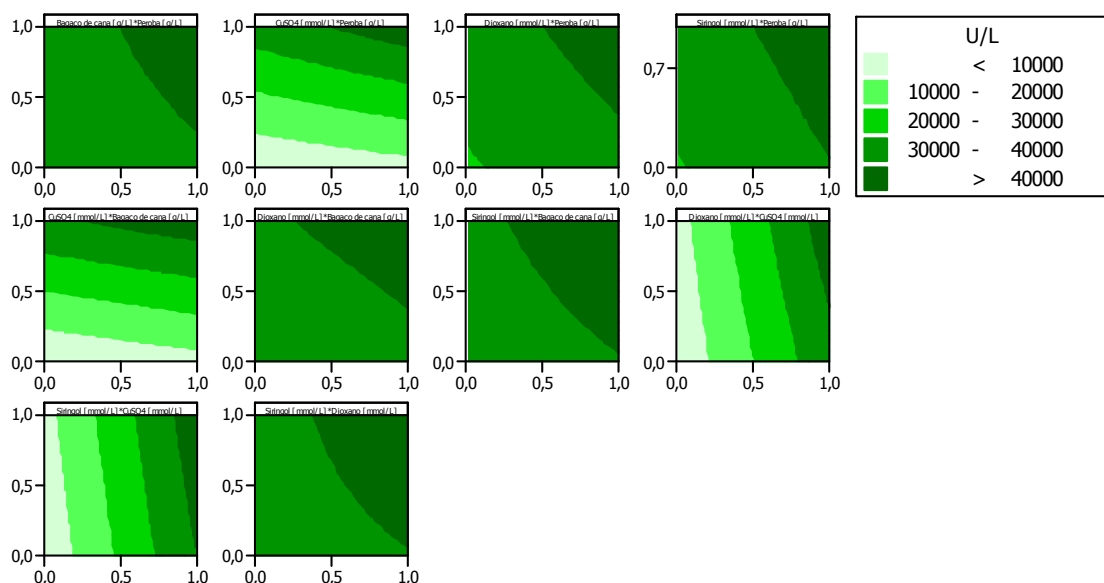
Os fatores determinantes na síntese de lacases variam conforme a espécie do fungo, bem como o tipo do substrato e a presença de indutores. Segundo Giardina e coautores (2010) diferentes fatores são capazes de modificar a transcrição dos genes da lacase, tais como tipo e concentração de nutrientes, condições experimentais, presença de íons metálicos e potenciais indutores.

O Gráfico 10 representa a relação entre uma resposta, em U L^{-1} de lacase e dois fatores, em três níveis de concentração. Ou seja, é possível estimar a síntese da lacase em U L^{-1} pela interação entre dois fatores em três níveis de concentração.

Deste modo é possível predizer, por exemplo, que valores de lacase superiores a 40.000 U L^{-1} serão obtidos pela aplicação dos extratos brutos de lignina PE e BC empregando-se as seguintes concentrações: BC ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e PE (1 g L^{-1}); BC ($0,8 \text{ g L}^{-1}$) e PE ($0,5 \text{ g L}^{-1}$); BC (1 g L^{-1}) e PE ($0,5 \text{ g L}^{-1}$); BC (1 g L^{-1}) e PE ($0,8 \text{ g L}^{-1}$); BC (1 g L^{-1}) e PE (1 g L^{-1}), entre outras combinações possíveis.

A interação entre o extrato BC e o siringol apresenta condições ótimas de produção de lacase ($>40.000 \text{ U L}^{-1}$) com aplicação de concentrações inferiores destes indutores, como por exemplo: BC ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e siringol ($0,6 \text{ g L}^{-1}$), informação relevante para futuros estudos.

GRÁFICO 10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA EM CONTOURO ENTRE DOIS FATORES



FONTE: O autor (2017).

4.3 EFEITO DO SOLVENTE ACETONITRILA NA ATIVIDADE DA LACASE

Na Tabela 13 estão apresentadas as atividades de lacase nos tempos 0, 1 e 2 horas de reação, bem como a porcentagem de atividade enzimática remanescente. A atividade da lacase no tempo zero (t_0), ou seja, antes da aplicação do solvente ACN foi registrada como 100%.

TABELA 13 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DESNATURANTE DA ACETONITRILA A 1,2% (V/V)

Tempo (h)	U L ⁻¹	% Atividade remanescente
t_0	66 ± 6,26	100,0
t_1	64 ± 3,57	95,5
t_2	65 ± 6,63	97,0

FONTE: O autor (2017).

O coeficiente de variação (CV) entre as médias foi de 1,54, e considerando-se que o coeficiente máximo admitido para a atividade de lacase, neste trabalho, foi um CV: 15 pode-se considerar que em concentração de 1,2% (v/v) em solução tamponada, a ACN não causou desnaturação da lacase no período analisado,

podendo este solvente ser empregado para o preparo de solução-mãe de BFA neste trabalho.

Shi e colaboradores (2014) investigaram o efeito desnaturante de diversos solventes sobre a lacase do fungo *Echinodontium taxodii*, pela incubação a temperatura de 30°C por um período de 10 min. A ACN em concentrações acima de 50% (v/v) inibiu completamente a atividade da lacase, porém em concentrações até 5% (v/v), não houve perda significativa da atividade. Em estudo realizado por Uzan e coautores (2009) com lacases produzidas pelos fungos *P. coccineus* e *P. sanguineus* foi avaliada a tolerância destas enzimas ao solvente ACN. Em 50% (v/v) deste solvente, as enzimas apresentaram cerca de 60% de atividade residual.

4.4 pH ÓTIMO E ESTABILIDADE DA LACASE

Os resultados obtidos por meio de ANOVA complementada por teste de Tukey com 95% de confiança (Tabela 14) demonstraram que o pH 4 não apresentou diferenças significativas entre o pH 5 e o pH 6, porém apresentou diferença com o pH 7.

TABELA 14 – ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DO pH ÓTIMO PARA A ATIVIDADE DA LACASE PRODUZIDA POR *Trametes* sp.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}	Valor p
pH (t_0)	3	59676167	19892056	11,03	6,59	0,021
Erro	4	7215417	1803854	---	---	---
Total	7	66891584	---	---	---	---

R²: 81,12%

FONTE: O autor (2017).

No entanto, como se pode observar na Tabela 15 o pH 4 obteve um valor médio de atividade de lacase ligeiramente superior ao pH 5 e 6, e o pH 7 apresentou o menor valor para a lacase.

TABELA 15– ATIVIDADE DA LACASE NO t_{0h} E NO t_{72h} PARA A ESTABILIDADE COM O pH

Atividade da lacase (U L ⁻¹) ± DP		
pH	t_0 (h)	t_{72} (h)
4	24875 ± 1119,6	19889 ± 2435,6
5	21729 ± 2327,6	23528 ± 2082,0
6	21917 ± 589,3	22278 ± 392,8
7	17229 ± 441,9	17250 ± 432,1

FONTE: O autor (2017).

Na Tabela 15 também são apresentadas as atividades médias da lacase no t_{72h} , e seus respectivos desvios padrões. Na Tabela 16 está apresentada a ANOVA complementada por teste de Tukey (95% de confiança) para a estabilidade do pH em 72h. O valor de $p < 0,05$ e F calculado maior que F tabelado mostra diferenças entre as médias das faixas de pH, enquanto que o Teste de Tukey mostra que a atividade da enzima lacase na faixa de pH testada não sofreu alterações significativas após incubação de 72 horas, ou seja, foi estável em toda faixa de pH.

TABELA 16 – ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DA LACASE PRODUZIDA POR *Trametes* sp. AO pH APÓS 72H DE INCUBAÇÃO

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}	Valor p
pH (t_{72h})	7	107728439	15389777	6,84	3,50	0,007
Erro	8	18007369	2250921	---	---	---
Total	15	125735808	---	---	---	---
R ² : 73,15%						

FONTE: O autor (2017).

Chen e colaboradores (2016) isolaram e purificaram uma isoforma da lacase de *Trametes versicolor* obtida por meio do cultivo em farelo de trigo e de amendoim em etanol 10% (v/v), na qual identificaram um pH ótimo de atividade entre 4,5 e 5,0 na faixa de temperatura entre 55 a 60°C.

Fonseca e coautores (2016) cultivaram quatro cepas de *Trametes* sp. provenientes da floresta de Misiones na Argentina, com e sem a presença de Cu^{2+} , para a produção de enzimas lignocelulolíticas. Os caldos enzimáticos brutos sem Cu^{2+} não apresentaram diferenças significativas na atividade de lacases nas faixas de pH entre 3,6 e 5,6. Já os caldos contendo Cu^{2+} apresentaram atividade elevada em pH 3,6.

A lacase produzida pelo fungo *Trametes versicolor* possui um pH ótimo de aproximadamente 5, e com boa estabilidade enzimática na faixa de pH de 4 a 7 (KIM; NICELL, 2006b).

Neste trabalho optou-se pelo emprego da solução tamponada McIlvaine em pH 5 para os testes de biorremediação de BFA, devido aos resultados apresentados nos experimentos realizados.

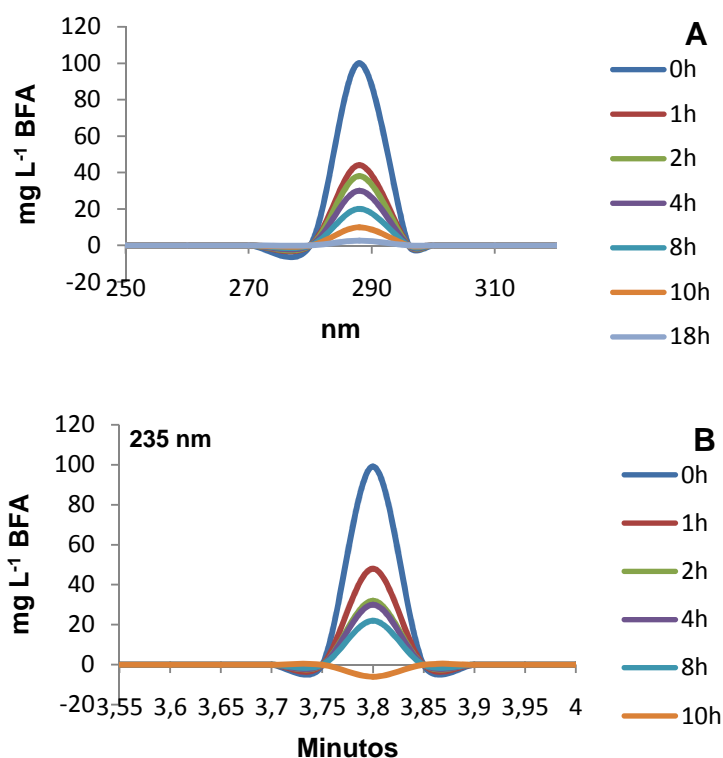
4.5 BIORREMEDIAÇÃO DO BISFENOL A E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS DERIVATIVA

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos na biorremediação do BFA com a lacase de *Trametes* sp., e também é realizada uma avaliação comparativa da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa para a determinação quantitativa do BFA em solução multicomponente contendo lacase bruta.

4.5.1 Biorremediação quantitativa do bisfenol A

A biorremediação do BFA em meio aquoso pela aplicação de lacase de *Trametes* sp. está apresentada no Gráfico 12, onde é possível visualizar em (A) a degradação em 18 h de incubação analisada por espectrofotometria UV-Vis derivativa de primeira ordem, e em (B) a degradação em 10 h de reação analisada por HPLC-DAD (cromatograma: APÊNDICE I).

GRÁFICO 11– DEGRADAÇÃO DO BISFENOL A POR LACASE DE *Trametes* sp.



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: A: Espectrofotometria UV-Vis derivativa de primeira ordem
B: HPLC-DAD.

Na Tabela 17 estão dispostas as médias obtidas para as triplicatas nos tempos de amostragem de 0, 1, 2, 4, 8, 10 e 18 h de reação do BFA com a lacase. Até o tempo t_{8h} , segundo ANOVA complementada por teste de Tukey com 95% de confiança, ambas as técnicas analíticas empregadas detectaram concentrações de BFA semelhantes, ou seja, sem diferenças estatísticas significantes. Apenas no tempo t_{10h} , onde já não foi mais possível detectar o BFA por HPLC-DAD, as médias entre as metodologias apresentaram uma diferença que foi considerada significativa em termos estatísticos.

TABELA 17 - CONCENTRAÇÕES RESIDUAIS DE BISFENOL A QUANTIFICADAS POR HPLC-DAD E ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS DERIVATIVA E COMPARAÇÃO POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA

mg L ⁻¹ de BFA			
Tempo (h)	HPLC-DAD	UV-Vis (1ª derivada)	HPLC-DAD x UV-Vis (1ª derivada) por teste de Tukey com 95% de confiança
t_0	98,80 ± 5,38	100,33 ± 4,04	Não há diferenças significativas entre as médias
t_1	48,33 ± 7,32	44,33 ± 2,08	Não há diferenças significativas entre as médias
t_2	32,40 ± 2,65	38,33 ± 2,08	Não há diferenças significativas entre as médias
t_4	30,02 ± 0,99	30,33 ± 2,08	Não há diferenças significativas entre as médias
t_8	21,95 ± 0,37	19,67 ± 0,59	Não há diferenças significativas entre as médias
t_{10}	-6,25 ± 2,00	10,00 ± 1,00	Há diferenças significativas entre as médias
t_{18}	-----	2,73 ± 0,31	-----

FONTE: O autor (2017).

Devido a análise espectrofotométrica UV-Vis ter detectado 10 mg L⁻¹ de BFA no t_{10h} , os experimentos e seus respectivos controles foram incubados por mais 8 h. A análise espectrofotométrica no t_{18h} revelou a presença de 2,73 ± 0,31 mg L⁻¹ de BFA na triplicata dos experimentos (Tabela 17).

A Tabela 18 apresenta a ANOVA, da biorremediação do BFA pela aplicação da lacase bruta produzida pelo fungo *Trametes* sp. quantificado por HPLC-DAD e espectrofotometria UV-Vis derivativa, que mostra que há diferenças significativas entre as médias, apresentando valor de $p < 0,05$, e de F calculado superior ao de F tabelado.

TABELA 18 – ANOVA COMPLEMENTADA POR TESTE DE TUKEY COM 95% DE CONFIANÇA DA QUANTIFICAÇÃO DE BISFENOL A DURANTE A BIORREMEDIAÇÃO PELA LACASE

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}	Valor p
BFA [mg L ⁻¹] HPLC-DAD x UV-Vis derivativa	12	37265,48	3105,46	321,70	2,15	0,000
Erro	26	250,99	9,65	---	---	---
Total	38	37516,47	---	---	---	---

R²: 73,15%

FONTE: O autor (2017).

No Gráfico 11, bem como na Tabela 17 é possível observar a redução na concentração do BFA ao longo do tempo por meio das análises de HPLC-DAD e UV-Vis.

Na primeira hora de reação ocorreu uma forte degradação reduzindo em aproximadamente 50% a concentração inicial de BFA neste experimento. Não houve diferenças significativas na degradação entre 2 a 4 h de incubação, de modo que a degradação do contaminante neste período foi de 60 a 70%.

Após 8 h de incubação cerca de 80% do BFA já havia sido remediado, e em 10 h de reação já não foi mais possível detectar o contaminante por HPLC-DAD, porém pela espectrofotometria derivativa de primeira ordem foi detectado um residual de aproximadamente 10 mg L^{-1} que corresponde a 10% da concentração inicial deste IE.

A análise no tempo de reação de 18 h, que foi realizada apenas por espectrofotometria derivativa, apresentou um residual equivalente a $2,73 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$ de BFA.

Alguns estudos de remoção de IEs, inclusive o BFA, por lacases estão relatados na literatura científica, sendo os principais empregados para a discussão deste trabalho.

Libardi Jr. (2010) avaliou a capacidade de degradação dos compostos interferentes endócrinos t-nonilfenol, bisfenol-A e 17- α -etinilestradiol pela lacase de *Pleurotus ostreatus* e de *Phoma* sp. A lacase de *Phoma* sp. reduziu a concentração de BFA em 89,75% em 24h, e após 48h já não foi possível detectar o contaminante. A lacase de *P. ostreatus* se mostrou mais eficiente, de modo que em 24h de reação não se detectou mais o BFA no experimento.

Enquanto que os pesquisadores Lin e colaboradores (2016) empregaram uma concentração de 10 mg L^{-1} de lacase pura de grau comercial de *T. versicolor* para remediar o BFA em concentração de 20 mg L^{-1} em solução tamponada em Ph 5. Após 12 h de reação o contaminante sofreu uma redução de 55% da sua concentração inicial.

Já Erkurt (2015) comparou a eficiência da lacase bruta de *Funalia trogii* e da lacase pura de grau comercial de *T. versicolor*, ambas com atividade de 23,4 U na degradação de 100 mg L^{-1} de BFA em meio aquoso. A lacase bruta de *F. trogii* degradou 100% do BFA em 4 horas de reação, enquanto que a lacase pura de

T. versicolor degradou somente 30%. O autor acredita que a maior eficiência da lacase bruta se deve ao fato da ação de metabólitos mediadores da lacase presentes no caldo da lacase bruta.

Gassara e coautores degradaram 26% do BFA presente em água em concentração inicial de 20 mg L^{-1} , em 8 h de tratamento, com o emprego do caldo bruto de *P. chrysosporium* contendo 60 U L^{-1} de manganês peroxidase, 50 U L^{-1} de lacase e 5 U L^{-1} de lignina peroxidase.

Os pesquisadores Zeng, Zhao e Xia (2017) avaliaram a produção de lacase pelo fungo *T. versicolor* com simultânea degradação de BFA em cultivo sólido de resíduos agrícolas contaminado com 25 mg kg^{-1} deste IE. Após 10 dias de cultivo observaram uma redução de 95% da concentração do contaminante no substrato.

Daâssi e colaboradores (2016) utilizaram lacases produzidas pelas cepas de *Coriolopsis gallica*, *Bjerkandera adusta* e *T. versicolor* (1000 U L^{-1}) para degradar BFA em água em concentração de 0,01% (v/v). A lacase de *C. gallica* degradou 100% do BFA em apenas 4 h de reação, enquanto que as demais necessitaram de 8 h para obter o mesmo resultado.

Chairin e coautores (2013) aplicaram lacase de *Trametes polyzona* (640 U L^{-1}), com e sem a adição do mediador redox 1-hidroxibenzotriazol (HBT), em experimentos de degradação de BFA em solução aquosa a 0,01% (v/v). A lacase purificada sem HBT removeu cerca de 20% do contaminante em 12 h de reação, já o experimento com lacase na presença de HBT removeu 100% da BFA em apenas 3 h.

Asadgol e pesquisadores (2014) avaliaram a capacidade catalítica da lacase produzida pelo fungo *Paraconiothyrium variabile* na remediação de BFA em água. No experimento foi empregada uma atividade enzimática de 5.000 U L^{-1} , em uma concentração de 4 mmol L^{-1} do contaminante. Após 40 min de reação 60% do BFA já havia sido remediado.

Garcia-Morales e colaboradores (2015) realizaram experimentos simultâneos de degradação dos IEs: BFA, 4-nonilfenol, 17- α -etinilestradiol e triclosan. A concentração de cada contaminante nos testes foi de 10 mg L^{-1} , e a atividade de lacase aplicada foi de 100 U L^{-1} , o que resultou em uma remoção de 90% do BFA após 6 h de reação.

Margot e coautores (2013) avaliaram a degradação de quatro IEs: BFA, ácido mefenâmico, triclosan e diclofenaco em concentração igual a 20 mg L^{-1} pela aplicação de lacase de *T. versicolor* com atividade equivalente a 730 U L^{-1} . O BFA apresentou uma redução de 90% após 40 min de reação.

Neste trabalho foi considerada a quantificação do BFA no experimento de biorremediação realizada por HPLC-DAD. A lacase bruta obtida por meio da otimização realizada na etapa B de produção se mostrou eficiente na degradação do BFA em meio aquoso tamponado em pH 5. Após 10 horas de reação da lacase bruta (500 U L^{-1}) com o BFA (100 mg L^{-1}), não foi mais possível detectar o contaminante por HPLC-DAD na solução.

Nos experimentos com o gênero *Trametes* relatados na literatura há uma variação nas porcentagens de remoção do BFA conforme a atividade enzimática aplicada, bem como a concentração do contaminante no meio.

4.5.2 Avaliação da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa

A técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa foi eficiente para a análise da biorremediação de BFA por lacase bruta de *Trametes* sp. quando comparada com a técnica de HPLC-DAD, nas condições deste trabalho (Tabelas 17 e 18).

No tempo de reação t_{10h} , no qual não foi mais possível detectar o BFA por HPLC-DAD ainda foi possível detectar um residual do contaminante por meio da derivada de primeira ordem, e nos tempos de análise anteriores a mesma apresentou os mesmos resultados obtidos pela técnica de cromatografia líquida.

Entretanto para se atestar a real eficácia desta técnica no emprego de análises com estas características é sumária a necessidade da execução de uma validação metodológica.

Não foram encontrados relatos na literatura do emprego da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa para análises de degradação de contaminantes emergentes por lacases. Este trabalho parece ser o primeiro a empregar esta técnica para este fim, além de realizar uma comparação com a técnica de HPLC-DAD.

A espectrofotometria derivativa pode ser bastante vantajosa em substituição à cromatografia líquida, nos casos pertinentes, pois se trata de uma técnica com custos reduzidos em relação a equipamentos e reagentes, além de não necessitar

de separações prévias da amostra.

5 CONCLUSÕES

Todos os extratos de lignina bruta apresentaram efeitos positivos na indução da produção de enzima lacase pelo basidiomiceto *Trametes* sp. No grupo madeiras, o extrato de peroba apresentou um fator de indução de 3,61 com atividade de $1922 \pm 77 \text{ U L}^{-1}$, resultado este superior ao dos extratos de bracatinga e pinus, e no grupo de resíduos agrícolas, o extrato de bagaço de cana-de-açúcar apresentou um F+: 3 com atividade de $1593 \pm 56 \text{ U L}^{-1}$, seguido do extrato de casca de trigo com e do extrato de casca de soja com atividades de $1520 \pm 59 \text{ U L}^{-1}$ e $602 \pm 29 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente.

Os resultados obtidos pela aplicação individualizada dos indutores (efeitos principais) na otimização da produção de lacase demonstraram que o cobre surtiu o maior efeito indutor atingindo o seu máximo no 16º dia de cultivo com um fator de indução igual a 27,34 e atividade de $17.222 \pm 231 \text{ U L}^{-1}$. Os demais indutores apresentaram valores máximos ao 7º dia de cultivo, sendo que o extrato de bagaço de cana-de-açúcar foi o que apresentou melhor desempenho com um F+: 5,06 e atividade de $900 \pm 29,4 \text{ U L}^{-1}$, seguido do dioxano com F+: 3,69 e $657 \pm 42,4 \text{ U L}^{-1}$, do siringol com um F+: 3,17 e atividade de $565 \pm 21 \text{ U L}^{-1}$, e do extrato de peroba com um F+: 2,61 e atividade de $465 \pm 43,2 \text{ U L}^{-1}$.

Os fatores de indução, tanto para os efeitos principais como para os efeitos das interações, foram maiores no início do cultivo para quase todos os experimentos, sofrendo redução dos seus valores ao longo do tempo. Entretanto a atividade de lacase foi crescente para os cultivos, inclusive para o controle sem adição de indutores.

O efeito das interações dos indutores que foi avaliado por meio da realização de um delineamento de experimentos fatorial fracionário⁵⁻² demonstrou que a melhor interação ao longo do experimento foi obtida pela aplicação de todos os indutores obtendo no 24º dia de cultivo uma atividade de lacase igual a $45.185 \pm 321 \text{ U L}^{-1}$, enquanto que o controle (sem adição de indutores) produziu $1527 \pm 84,9 \text{ U L}^{-1}$. Para este experimento a otimização pela aplicação combinada de indutores aumentou em aproximadamente 30 vezes a produção de lacase por *Trametes* sp. O efeito da interação entre os extratos de bagaço de cana-de-açúcar e de peroba juntamente com o CuSO_4 também foi superior aos demais alcançando $35.926 \pm 642 \text{ U L}^{-1}$, bem

como a interação entre o extrato de peroba, dioxano e CuSO_4 que produziu $35.556 \pm 1.111 \text{ U L}^{-1}$ de atividade.

A faixa de pH ótimo para a lacase foi de 4 a 6, porém em pH 4 observou-se um ligeiro aumento na atividade enzimática. A lacase se manteve estável em incubação de 72h nas faixas de pH de 4 a 7.

A aplicação da lacase bruta com atividade de 500 U L^{-1} para a biorremediação de 100 mg L^{-1} de BFA em meio aquoso a pH 5 foi eficiente, sendo que na primeira hora de reação ocorreu uma forte degradação reduzindo em aproximadamente 50% a concentração inicial do BFA. Após 8 h de incubação cerca de 80% do BFA já havia sido remediado, e em 10 h de reação já não foi mais possível detectar o contaminante. Deste modo, pode-se afirmar a eficiência e aplicabilidade de lacases fúngicas para o tratamento do interferente endócrino BFA em meio aquoso.

A avaliação da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa de primeira ordem foi eficiente para a análise do BFA em solução contendo lacase bruta de *Trametes* sp. quando comparada com a técnica de HPLC-DAD. Entretanto para se atestar a real eficácia desta técnica no emprego de análises com estas características é necessária a execução de uma validação metodológica, visto que não foram encontrados relatos na literatura do emprego da técnica de espectrofotometria UV-Vis derivativa para análises de degradação de contaminantes emergentes por lacases.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em relação às lacases, existem alguns tópicos que poderão ser melhor explorados em trabalhos futuros, tais como:

- I. Avaliação da cinética enzimática para o BFA e outros contaminantes fenólicos;
- II. Avaliação da eficiência de lacases para remediação de outros interferentes endócrinos, além do BFA;
- III. Elaboração de procedimentos para purificação e imobilização das lacases visando a sua aplicação em escala real (tratamento terciário de água);

- IV. Avaliação do emprego combinado de mediadores químicos com as lacases para tratamento de aromáticos não-fenólicos;
- V. Determinação da toxicidade dos subprodutos gerados no tratamento de contaminantes com a lacase.
- VI. Expressão de lacases em microrganismos eucarióticos.
- VII. Validação metodológica da espectrofotometria UV-Vis derivativa para determinação de BFA e outros IEs em solução multicomponente contendo lacase.

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, A. E.; GUO, C.; LIU, C.-Z. Lignin-Enhanced Laccase Production from *Trametes versicolor*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 4, p. 1061–1066, 8 jun. 2017.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.
- ALMEIDA, A. R. **Estudo da imobilização da lacase em nanopartículas magnéticas e sua aplicação**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial e Ambiental) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Curitiba, 2015.
- ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; MIRANDA, R. C. M.; MACIEL, C. C. S. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, p. 1–10, 2012.
- ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and natural attenuation: Process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006.
- ALVES, F. **Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para produção de enzima lacase**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Eng. de Processos Químicos e Bioquímicos) - Setor de Engenharia, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.
- ANDRADE, Â. L. C. DE. **Aspectos do crescimento e influência de parâmetros físicos na atividade da lacase do fungo amazônico *Trametes lactinea***. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Setor de Biotecnologia, Universidade de Estado do Amazonas, Manaus, 2011.
- AQUINO, S. F. DE; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Eng Sanit ...**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.
- ARORA, D. S.; SHARMA, R. K. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1760–1788, 2010.
- ASGHER, M.; NASIR IQBAL, H. M.; ASAD, M. J. Kinetic characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid state bio-processing of corncobs. **BioResources**, v. 7, n. 1, p. 1171–1188, 2012.

AYDINOĞLU, T.; SARGIN, S. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 2, p. 215–222, 2013.

AZEVEDO, D. D. A.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Occurrence of Nonylphenol and Bisphenol-A in Surface Waters from Portugal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 4, p. 532–537, 2001.

AZEVEDO, D. DE A. **Cogumelos: um guia prático**. São Paulo: Nobel, 1999.

BALDISSERA, D. B.; ZIEGLER, S.; CARINE, M.; STEFFLER, R.; RAFFIN, R. P.; ROGGIA, I.; JÚLIA, A.; DALCIN, F.; GOMES, P. Derivative ultraviolet spectrophotometry method to determinate synephrine in lipid nanocarrier. **Disciplinarum Scientia**, v. 17, n. 3, p. 447–463, 2016.

BARBOSA, B. C. A.; PAULINO, R. DE S.; PESSOA, K. DE A. R.; SILVA, G. M. M.; AQUINO, M. D. DE. Potencial de remoção de disruptor endócrino atrazina por *Aspergillus niger* an 400 em reatores de bancada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 5., 2014, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: IBEAS, 2014 p. 1–5

BARRASA, J. M.; BLANCO, M. N.; ESTEVE-RAVENTÓS, F.; ALTÉS, A.; CHECA, J.; MARTÍNEZ, A. T.; RUIZ-DUEÑAS, F. J. Wood and humus decay strategies by white-rot basidiomycetes correlate with two different dye decolorization and enzyme secretion patterns on agar plates. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 106–114, nov. 2014.

BAUGROS, J.; GIROUD, B.; DESSALCES, G. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 191–203, 2008.

BENTO, F. M.; ANASTÁCIO, F.; CAMARGO, D. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 65–68, 2003.

BERNARDO, P. E. M.; NAVAS, S. A.; MURATA, L. T. F.; ALCÂNTARA, M. R. DA S. DE. Bisfenol A : o uso em embalagens para alimentos , exposição e toxicidade – Uma Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 1–11, 2015.

BESERRA, M. R.; SCHIAVINI, J. DE A.; RODRIGUES, W. C. E PEREIRA, C. DE S. S. O Bisfenol A : Sua Utilização e a Atual Polêmica em Relação aos Possíveis Danos à Saúde Humana Bisphenol A : Possible Damage to Human Health. **Revista Eletrônica TECCEN**, v. 5, n. 1, p. 37–46, 2012.

BETTIN, F.; ROSA, L. O. DA; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; MALVESS, E.; SILVEIRA, M. M. DA; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 758–764, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BİRHANLI, E.; YEŞİLADA, Ö. The effect of various inducers and their combinations with copper on laccase production of *Trametes versicolor* pellets in a repeated-batch process. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 1–13, 2017.

BOGNOLA, I. A. **Unidades de manejo para *Pinus taeda* L. no planalto norte catarinense, com base em características do meio físico**. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BÖLICHE, S.-M.; TERNES, W. Isolation and identification of oxidation products of syringol from brines and heated meat matrix. **Meat Science**, v. 118, p. 108–116, 2016.

BORTOLETTO, M. M. F.; CARNEIRO, A. A.; SOUSA, A. O.; FERNANDES, L. C.; NAVES, L. D.; NOGUEIRA, M. M.; PINTO, C. O. Confecção de concreto utilizando a cinza do bagaço da cana-de-açúcar como agregado miúdo. In: ENCONTRO DE TECNOLOGIA DA UNIUBE, 8., 2014, Uberaba. **Anais...** Uberaba: UNIUBE, 2014 p. 1–3

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 15 abr. 1995.

CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 1, p. 23–31, 2007.

CALHEIROS, C. S. C.; AMORIM, C. L.; CASTRO, P. M. L. Tratamento biológico de água residual: soluções para diferentes tipologias. In: CONGRESSO NACIONAL DA ORDEM DOS ENGENHEIROS, XX, 2014. **Anais...** Lisboa: Ingenium, 2014 p. 87

CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A. Produtos Naturais E Alimentos Com Potencial Fitoestrogênico : Um Futuro Tratamento Para O Câncer De Mama? (C. e Tecnologia, Ed.) In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA SUCROENERGÉTICA E DE BIOCOMBUSTÍVEIS, 2., 2014, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, 2014 p. 63–67

CARNEIRO, A. F. DA C. **Determinação de Bisfenol A em água por microextração líquido-líquido dispersiva e cromatografia líquida com detecção por fluorescência**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

CARPANEZZI, A. A.; LAURENT, J.-M. E.; CARVALHO, P. E. R.; PEGORARO, A.; BAGGIO, A. J.; ZANON, A.; OLIVEIRA, E. B. DE; IEDE, E. T.; ROTTA, E.; STURION, J. A.; PEREIRA, J. C. D.; GRAÇA, L. R.; RAUEN, M. DE J.; CARPANEZZI, O. T. B.; OLIVEIRA, Y. M. M. DE. **Manual técnico da bracatinga (Mimosa scabrella Benth)**. Colombo: EMBRAPA, 1988.

CARRAHER JR., C. E. **Carraher's polymer chemistry**. Nova Iorque: CRC Press, 2016.

CARRERA, G.; VEGUÉ, L.; BOLEDA, M. R.; VENTURA, F. Simultaneous determination of the potential carcinogen 1,4-dioxane and malodorous alkyl-1,3-dioxanes and alkyl-1,3-dioxolanes in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 1–13, 2017.

CARVALHO, P. E. R. DE. Peroba-rosa - Aspidosperma polyneuron. **Circular Técnica**, n. 96, p. 12, 2004.

CASTAÑO, J. D.; CRUZ, C.; TORRES, E. Optimization of the production, purification and characterization of a laccase from the native fungus Xylaria sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 710–716, 2015.

CATHERINE, H.; PENNINGCKX, M.; FRÉDÉRIC, D. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. **Environmental Technology & Innovation**, v. 5, p. 250–266, 2016.

CAVALLAZZI, J. R. P.; OLIVEIRA, M. G. D. A.; KASUYA, M. C. M. Laccase production by *Lepista Sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 261–263, 2004.

CHAVES, K. S. **Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A , β - estradiol, 17α - etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul**. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Setor de Engenharia, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

CHEN, L.; WANG, X.; YANG, H.; LU, Q.; LI, D.; YANG, Q.; CHEN, H. Study on pyrolysis behaviors of non-woody lignins with TG-FTIR and Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 113, p. 499–507, 2015a.

CHEN, L.; YI, X.; DENG, F.; FANG, W.; ZHANG, X.; WANG, X.; FANG, Z.; XIAO, Y. A novel ethanol-tolerant laccase, TvIac, from *Trametes versicolor*. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 3, p. 471–476, 9 mar. 2016.

CHEN, M.; ZENG, G.; LAI, C.; LI, J.; XU, P.; WU, H. Molecular basis of laccase bound to lignin: insight from comparative studies on the interaction of *Trametes versicolor* laccase with various lignin model compounds. **RSC Adv.**, v. 5, n. 65, p. 52307–52313, 2015b.

CORRALES, J.; KRISTOFKO, L. A.; STEELE, W. B.; YATES, B. S.; BREED, C. S.; WILLIAMS, E. S.; BROOKS, B. W. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. **Dose-Response: An International Journal**, v. 13, n. 3, 2015.

COSTA, E. M. F.; SPRITZER, P. M.; HOHL, A.; BACHEGA, T. A. S. S. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 153–161, mar. 2014.

D'AGOSTINI, É. C.; MANTOVANI, T. R. D.; VALLE, J. S. DO; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 295–300, 2011.

D'ALFONSO, C.; LANZALUNGA, O.; LAPI, A.; VADALÀ, R. Comparing the catalytic efficiency of ring substituted 1-hydroxybenzotriazoles as laccase mediators. **Tetrahedron**, v. 70, n. 18, p. 3049–3055, 2014.

DA SILVA, L. C. R.; MACHADO, S. DO A.; GALVÃO, F.; FILHO, A. F. Evolução estrutural de bracingais da região Metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 171–179, 2016.

DAÂSSI, D.; PRIETO, A.; ZOUARI-MECHICHI, H.; MARTÍNEZ, M. J.; NASRI, M.; MECHICHI, T. Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 181–188, 2016.

DAASSI, D.; ZOUARI-MECHICHI, H.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J.; NASRI, M.; MECHICHI, T.; ŠEVČU, A. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment. **World J Microbiol Biotechnol**, n. 29, p. 2145–2155, 2013.

DAI, Y.; YAO, J.; SONG, Y.; LIU, X.; WANG, S.; YUAN, Y. Enhanced performance of immobilized laccase in electrospun fibrous membranes by carbon nanotubes modification and its application for bisphenol A removal from water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 317, p. 485–493, 2016.

DAWSON, R. M.; ELLIOTT, D. C.; ELLIOTT, W. H.; JONES, K. M. **Data for biochemical research**. New York: Oxford University Press, 1986.

DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial Laccases and their applications: a review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 98–124, 2011.

DIAS, R. V. A. **Avaliação da ocorrência de microcontaminantes emergentes em sistemas de abastecimento de água e da atividade estrogênica do etinilestradiol**. 177 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Setor de Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

DIL, E. A.; GHAEDI, M.; GHAEDI, A. M.; ASFARAM, A.; GOUDARZI, A.; HAJATI, S.; SOYLAK, M.; AGARWAL, S.; GUPTA, V. K. Modeling of quaternary dyes adsorption onto ZnO-NR-AC artificial neural network: Analysis by derivative spectrophotometry. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 34, p. 186–197, fev. 2016.

DODDS, E. C.; GOLDBERG, L.; LAWSON, W.; ROBINSON, R. Estrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. **Nature Publishing Group**, v. 141, n. 3562, p. 247–248, 1938.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M.; KVESITADZE, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 998–1004, 2006.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457–462, 2008.

(EMBRAPA). **Soja**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

ERKURT, H. A. Biodegradation and Detoxification of BPA : Involving Laccase and a Mediator. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 42, n. 9999, p. 1–8, 2015.

ESTEBAN, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Science of the total environment analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. **Science of the Total Environment**, v. 466–467, p. 939–951, 2014.

FAVERO, D. M.; HAMERSKI, F.; AQUINO, A. D. DE. Starch and ICUMSA color removal in sugarcane juice clarified by carbonatation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 4, p. 745–751, 12 set. 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FERRARIO, V.; CHERNYKH, A.; FIORINDO, F.; KOLOMYTSEVA, M.; SINIGOI, L.; MYASOEDOVA, N.; FATTOR, D.; EBERT, C.; GOLOVLEVA, L.; GARDOSI, L. Investigating the Role of Conformational Effects on Laccase Stability and Hyperactivation under Stress Conditions. **ChemBioChem**, v. 16, n. 16, p. 2365–2372, 1 nov. 2015.

FERREIRA, A. R. **Análise genética e seleção em testes dialélicos de Pinus taeda L.** 220 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FERREIRA, T. L. **A bracatinga (Mimosa scabrella) como componente arbóreo em pastagem polifítica sob pastoreio racional Voisin.** 163 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Setor de Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

FOCAZIO, M. J.; KOLPIN, D. W.; BARNES, K. K.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; THURMAN, M. E. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources. **Science of the Total Environment**, v. 402, p. 201–216, 2008.

FONSECA, M. A. **Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja.** 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Setor de Eng. Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

FONSECA, M. I.; TEJERINA, M. R.; SAWOSTJANIK-AFANASIUK, S. S.; GIORGIO, E. M.; BARCHUK, M. L.; ZAPATA, P. D.; VILLALBA, L. L. Preliminary studies of new strains of Trametes sp. From Argentina for laccase production ability. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 287–297, 2016.

FONTANA, J. D.; KRIEGER, N.; RAMOS, L. P. Physical methods applied to biotechnology. In: H.W.DOELLE (Ed.). **Encyclopedia of Life Support Systems**. 3. ed. St. Aldates: BIOTECHNOLOGY, 2002. v. 2p. 100–127 .

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6–16, 2010.

FRANCK, H.-G.; STADELHOFFER, J. W. **Industrial aromatic chemistry: Raw materials, processes and products**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988.

FRAZÃO, C. J. R.; SILVA, N. H. C.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; XAVIER, A. M. R. B.; TAVARES, A. P. M. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500–508, 2014.

FU, P.; KAWAMURA, K. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 10, p. 3138–3143, 2010.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3133–3139, 2001.

GALDAMEZ, E. V. C.; CARPINETTI, L. C. R. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos no processo de injeção plástica. **Gestão & Produção**, v. 11, n. 1, p. 121–134, abr. 2004.

GAMA, M. R. Processos fenton como alternativa na remoção de interferentes endócrinos e outros micropoluentes ambientais. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 777–787, 2012.

GARCIA-MORALES, R.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.; GOMEZ-MARISCAL, K.; ORONA-NAVAR, C.; HERNANDEZ-LUNA, C.; TORRES, E.; PARRA, R.; CÁRDENAS-CHÁVEZ, D.; MAHLKNECHT, J.; ORNELAS-SOTO, N. Biotransformation of Endocrine-Disrupting Compounds in Groundwater: Bisphenol A, Nonylphenol, Ethynylestradiol and Triclosan by a Laccase Cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 8, p. 251, 10 ago. 2015.

GASSARA, F.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. **Chemosphere**, v. 92, n. 10, p. 1356–1360, ago. 2013.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.

GE, H.; GAO, Y.; HONG, Y.; ZHANG, M.; XIAO, Y.; TENG, M.; NIU, L. Structure of native laccase B from *Trametes* sp. AH28-2. **Acta Crystallographica Section F**, v. 66, n. 3, p. 254–258, mar. 2010.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 57, p. 264–279, 2013.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GIMILIANI, G. T.; FONTES, R. F. C.; ABESSA, D. M. DE S. Modeling the dispersion of endocrine disruptors in the Santos Estuarine System (São Paulo State, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 64, n. 1, p. 1–8, 2016.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 323–330, ago. 2000.

GOMAA, E. A.; NEGM, A.; TAHOON, M. A. Conductometric and volumetric study of copper sulphate in aqueous ethanol solutions at different temperatures. **Journal of Taibah University for Science**, 2016.

GONÇALVES, E. S. **Ocorrência e distribuição de fármacos, cafeína e bisfenol-A em alguns corpos hídricos no estado do Rio de Janeiro**. 198 f. Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental) - Setor de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

(GOURMELON, G.). **Global plastic production rises, recycling lags**. **Worldwatch Institute, Washington**. Disponível em: <<http://www.worldwatch.org/global-plastic-production-rises-recycling-lags-0>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

(GRAND VIEW RESEARCH INC.). **Bisphenol A (BPA) market analysis by application (polycarbonates, epoxy resins) and segment forecasts to 2020**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-bisphenol-a-bpa-market>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, n. 18, p. 5813–5833, 15 nov. 2012.

HAMMAD, A. Y.; AWAD, F. M.; SHUKRAT, W.; ABDELGADIR, A. Determination amount of bisphenol A in drugs and water drinking container in Khartoum State, Sudan. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, n. 6, p. 609–612, 2015.

HARLEY, K. G.; GUNIER, R. B.; KOGUT, K.; JOHNSON, C.; BRADMAN, A.; CALAFAT, A. M.; ESKENAZI, B. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children. **Environmental Research**, v. 126, p. 43–50, 2013.

HESPANHOL, I. Reúso potável direto e o desafio dos poluentes emergentes. **Revista USP**, v. 106, p. 79–94, 2015.

HINDI, S. S. Z. Evaluation of guaiacol and syringol emission upon wood pyrolysis for some fast growing species. **Engineering and Technology**, v. 5, n. 8, p. 583–587, 2011.

HOU, J.; DONG, G.; LUU, B.; SENGPIEL, R. G.; YE, Y.; WESSLING, M.; CHEN, V. Hybrid membrane with TiO₂ based bio-catalytic nanoparticle suspension system for the degradation of bisphenol-A. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 475–483, 2014.

IVANEC-GORANINA, R.; KULYS, J.; BACHMATOVA, I.; MARCINKEVIČIENĖ, L.; MEŠKYS, R. Laccase-catalyzed bisphenol A oxidation in the presence of 10-propyl sulfonic acid phenoxazine. **Journal of Environmental Sciences**, v. 30, p. 135–139, 2015.

JEON, J.; CHANG, Y. Laccase-mediated oxidation of small organics : bifunctional roles for versatile applications. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 335–341, 2013.

JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. **Cell Mol Life Sci.**, v. 72, n. 5, p. 869–883, 2016.

JONKERS, N.; KOHLER, H.-P. E.; DAMMSHÄUSER, A.; GIGER, W. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. **Environmental Pollution**, n. 157, p. 714–723, 2009.

KHARRAZIAN, D.; VOJDANI, A. Correlation between antibodies to bisphenol A, its target enzyme protein disulfide isomerase and antibodies to neuron-specific antigens. **Journal of Applied Toxicology**, 2016.

KIM, Y. J.; NICELL, J. A. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, p. 1431–1442, 2006a.

KIM, Y. J.; NICELL, J. A. Laccase catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1029–1037, 2006b.

KLEIN, D. R.; ANDRADE, M. M.; DERENGOSKI, J. A.; DUARTE, E. Aspectos gerais e silviculturais de *Cordia americana*, *Aspidosperma polyneuron*, *Toona ciliata* e. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 15, n. 2, p. 155–164, 2016.

KLEYWEGT, S.; PILEGGI, V.; YANG, P.; HAO, C.; ZHAO, X.; ROCKS, C.; THACH, S.; CHEUNG, P.; WHITEHEAD, B. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada — Occurrence and treatment efficiency. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1481–1488, 2011.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; ANZALDO, J. H.; ANDRADE, A. **Química da madeira: Manual didático**. 3^a Ed. ed. Curitiba: Fuped do Paraná, 2005.

KUBO, S.; KADLA, J. F. Hydrogen bonding in lignin: A fourier transform infrared model compound study. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2815–2821, 2005.

LANGE, C.; KUCH, B.; METZGER, J. W. Untersuchung von Mineralwässern auf estrogen Wirkung mittels E-Screen-Assay. **GWF - Wasser**, v. 9, p. 982–987, 2013.

LAURAGUAIS, A.; COEUR-TOURNEUR, C.; CASSEZ, A.; SEYDI, A. Rate constant and secondary organic aerosol yields for the gas-phase reaction of hydroxyl radicals with syringol (2,6-dimethoxyphenol). **Atmospheric Environment**, v. 55, p. 43–48, 2012.

LI, B.; LV, W.; ZHANG, Q.; WANG, T.; MA, L. Pyrolysis and catalytic pyrolysis of industrial lignins by TG-FTIR: Kinetics and products. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 108, p. 295–300, 2014.

LI, J.; WANG, G. Airborne particulate endocrine disrupting compounds in China: Compositions, size distributions and seasonal variations of phthalate esters and bisphenol A. **Atmospheric Research**, v. 154, p. 138–145, 2015.

LI, S.; TANG, B.; LIU, Y.; CHEN, A.; TANG, W.; WEI, S. High-level production and characterization of laccase from a newly isolated fungus *Trametes* sp. LS-10C. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 278–285, 2016.

LI, X.; YING, G.-G.; ZHAO, J.-L.; CHEN, Z.-F.; LAI, H.-J.; SU, H.-C. 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. **Environment International**, v. 52, p. 81–86, 2013.

LIBARDI JR., N. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Setor de Eng. de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

LIN, J.; LIU, Y.; CHEN, S.; LE, X.; ZHOU, X.; ZHAO, Z.; OU, Y.; YANG, J. Reversible immobilization of laccase onto metal-ion-chelated magnetic microspheres for bisphenol A removal. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 189–199, 2016.

LING, Z.; WANG, S.; ZHU, M.; NING, Y.; WANG, S.; LI, B.; YANG, A.; ZHANG, G.; ZHAO, X. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 785–793, 2015.

LIU, Y.; CUSANO, A. M.; WALLACE, E. C.; MEKMOUCHE, Y.; ULLAH, S.; ROBERT, V.; TRON, T. Characterization of C-terminally engineered laccases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 435–441, 2014.

LOOS, R.; LOCORO, G.; CONTINI, S. Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS 2 analysis. **Water Research**, v. 44, n. 7, p. 2325–2335, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202–212, 15 jan. 2005.

MANAHAN, S. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2013.

MANKAR, S. S.; CHAUDHARI, A. R.; SONI, I. Lignin in phenol-formaldehyde adhesives. **International Journal of Knowledge Engineering**, v. 3, n. 1, p. 116–118, 2012.

MANTOVANI, T. R. D. A.; MEIRELLES, L. D. P.; DO VALLE, J. S.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1681–1692, 2012.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-química) - Setor de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Setor de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M.; SONNENSCHN, C. Endocrine disruptors : from Wingspread to environmental developmental biology. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 83, p. 235–244, 2003.

MATTA, M. H. DE R. DA; PEREIRA, A. L.; MONTAGNER, É.; FORTUNATO, G. V. Determinação de bisfenol A (BFA) em água mineral por meio de CG/DCE – uma nova proposta de metodologia para análise. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 624–629, 2012.

MELO, L. F. L. DE. **Extração, caracterização e utilização da lignina da casca do coco verde em poliuretano**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MELO, T. L. DE; LUNA, M. A. C.; SILVA, L. A. DE O. DA; CAMPOS-TAKAKI, G. M. DE; SILVA, C. A. A. DA. A avaliação do potencial de amostras de *Aspergillus* ssp. isoladas da caatinga para produção de lacase. **E-xacta**, v. 8, n. 1, p. 67–75, 2015.

MENDONÇA, K.; HAUSER, R.; CALAFAT, A. M.; ARBUCKLE, T. E.; DUTY, S. M. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 2014.

MERCEA, P. Physicochemical Processes Involved in Migration of Bisphenol A from Polycarbonate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, p. 579–593, 2009.

MICHAŁOWICZ, J. Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738–758, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Legislação do Ministério da Saúde, Brasília, 12 dezembro 2011.: Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em : 18 maio 2017., [s.d.].

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

MONTEIRO, M. B. DE O.; PEREIRA, R. P. W.; ABREU, H. DOS S. Análise composicional por Espectrometria de Infravermelho da Lignina de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Tratados com Reguladores de Crescimento. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 48–56, 2013.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 7. ed. New York: Wiley, 2008.

MORANDIM-GIANNETTI, A.; SILVA, J. M.; PEREIRA, I. A. Estudo do processo de recuperação e fracionamento da lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014. **Anais...** Florianópolis: COBEQ, 2014 p. 1–7

MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUTRIM, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI/LC/IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, n. 12, p. 1409–1417, 2011.

MOREIRA, W. D. S. **Relações entre propriedades físico-mecânicas e características anatômicas e químicas da madeira**. 119 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Setor de Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

MORENO-VILET, L.; BONNIN-PARIS, J.; BOSTYN, S.; RUIZ-CABRERA, M. A.; MOSCOSA-SANTILLÁN, M. Assessment of sugars separation from a model carbohydrates solution by nanofiltration using a design of experiments (DoE) methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 131, p. 84–93, 2014.

MURRAY, P.; ROSENTHA, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2014.

NAIN, A. K.; CHAUDHARY, N.; ANKITA; GUPTA, J.; CHANDRA, P. Physicochemical study of intermolecular interactions in 1,4-dioxane + aromatic hydrocarbons binary mixtures at different temperatures by using ultrasonic and viscometric methods. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 108, p. 145–161, 2017.

NAKAGAWA, H.; TAKAGI, S.; MAEKAWA, J. Fered-Fenton process for the degradation of 1,4-dioxane with an activated carbon electrode: A kinetic model including active radicals. **Chemical Engineering Journal**, v. 296, p. 398–405, 2016.

NETO, J. R. T. DE V. **Diversidade E seleção de fungos basidiomicetos afiloforóides para produção de enzimas lignocelulolíticas em área de mata atlântica do sul da Bahia**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Setor de Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

NETO, S. L. M. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. 169 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NYANHONGO, G. S.; GÜBITZ, G.; SUKYAI, P.; LEITNER, C. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: A wealth of catalytic activity. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 45, n. 3, p. 250–268, 2007.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2009-2011. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 1–16, jan. 2013.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 105–113, 2003.

PATEL, S. K. S.; KALIA, V. C.; CHOI, J. H.; HAW, J. R.; KIM, I. W.; LEE, J. K. Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 639–647, 2014.

PATIÑO, Y.; DÍAZ, E.; ORDÓÑEZ, S.; GUERRERO-RUIZ, E. G.-S. A.; RODRÍGUEZ-RAMOS, I. Adsorption of emerging pollutants on functionalized multiwall carbon nanotubes. **Chemosphere**, v. 136, p. 174–180, 2015.

PEREIRA, A. S. G.; SANTOS, S. F. M.; MOREIRA, E. D. T.; ARAÚJO, M. C. U. DE. Bisfenol A: Detecção em água potável e eficiência na remoção utilizando filtros comerciais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014. **Anais...** Florianópolis: COBEQ, 2014 p. 1–8

PEREIRA, R. DE O.; CARMINATO, V. M.; VIEIRA, E. M.; DANIEL, L. A. Degradação parcial de 17 β -estradiol por cloração aplicada ao tratamento da água. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 215–222, 2013.

PINAZO, M.; MOSCOVICH, F.; DUMMEL, C.; KNEBEL, O. Patrón espacial de la regeneración de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. en un bosque sometido a aprovechamiento selectivo en el norte de la provincia de misiones. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 3, p. 237–245, 2009.

PIRES, ADRIANA M. MORENO; MATTIAZZO, M. E. Avaliação da viabilidade do uso de resíduos na agricultura. **Circular Técnica 19 - Embrapa**, n. 1516–4683, p. 1–9, 2008.

PISTONE, L.; OTTOLINA, G.; DE, S.; ROMERO, A. A.; MARTINS, L. O.; LUQUE, R. Encapsulated Laccases for the Room-Temperature Oxidation of Aromatics: Towards Synthetic Low-Molecular-Weight Lignins. **ChemSusChem**, v. 9, n. 7, p. 756–762, 7 abr. 2016.

PRASETYO, E. N.; SEMLITSCH, S.; NYANHONGO, G. S.; LEMMOUCHI, Y.; GUEBITZ, G. M. Laccase oxidation and removal of toxicants released during combustion processes. **Chemosphere**, v. 144, p. 652–660, 2016.

PRINS, G. S.; HU, W.-Y.; SHI, G.-B.; HU, D.-P.; MAJUMDAR, S.; LI, G.; HUANG, K.; NELLES, J. L.; HO, S.-M.; WALKER, C. L.; KAJDACSY-BALLA, A.; VAN BREEMEN, R. B. Bisphenol A Promotes Human Prostate Stem-Progenitor Cell Self-Renewal and Increases In Vivo Carcinogenesis in Human Prostate Epithelium. **Endocrinology**, v. 155, n. 3, p. 805–817, 2014.

QUEDNOW, K.; PU, W. Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse , Germany : Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 476–483, 2008.

QUEIROZ, F. B. DE. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Setor de Tecnologias Ambientais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

QUINELATO, C. **Método de extração da lignina do bagaço da cana-de-açúcar da região noroeste do estado de São Paulo**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2016.

(RESEARCH AND MARKETS). **Bisphenol-A: A global market overview. Dublin, 2016. Relatório técnico**. Disponível em: <http://www.researchandmarkets.com/research/mgg8v9/bisphenola_a>. Acesso em: 23 jan. 2017.

REZENDE, D. F. DE. **Estudo comparativo de características físico-químicas e nutricionais da soja preta e amarela**. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Setor de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RIBEIRO, C.; PARDAL, M. Â.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary , Portugal. **Environ Monit Assess**, v. 1, p. 1–11, 2008.

RIBEIRO, M. V. DE M.; MELO, I. DA S.; LOPES, F. DAS C. DA C.; MOITA, G. C. Development and validation of a method for the determination of folic acid in different pharmaceutical formulations using derivative spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 4, p. 741–750, 2016.

RIVERA-HOYOS, C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3–4, p. 67–82, 2013.

ROCHA, M. S. R. DOS SANTOS; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. GO. DA. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017.

RODRIGUES, D. M.; SILVA, A. F. DA; MARINS, F. A. S.; MIRANDA, R. DE C.; DIAS, É. X.; LUCHE, J. R. D. Utilização da Otimização Multiobjetivo em Problemas de Delineamento de Experimentos Com Múltiplas Respostas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA OPERACIONAL, XLVII, 2015. **Anais...** Porto de Galinhas: SBPO, 2015 p. 1–14

RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; JUNIOR, A. S. P.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 31–37, 2014.

SADAVA, D.; HELLER, C.; ORIAN, G. H.; PURVES, W. K.; HILLIS, D. M. **Vida: A Ciência da Biologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; CONCHA-GRAÑA, E.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 1–8, 2012.

SALIBA, E. DE O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. DE; PILO-VELOSO, D. Ligninas – Métodos De Obtenção E Caracterização Química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2001.

SAMARANAYAKA, L. **Fundamentos de microbiologia e imunologia na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012.

SANTANA, J. DA S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SANTOS, P. S. B.; SOARES, A. K.; FUENTES, S.; LABIDI, J.; GATTO, D. A. Caracterização da lignina obtida da madeira de diferentes espécies por meio do processo organosolv. **Revista Ciência da Madeira**, v. 6, n. 3, p. 237–243, 2015.

SCHNEIDER, C. F.; SCHULZ, D. G.; LIMA, P. R.; JÚNIOR, A. C. G. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 5, p. 08–17, 2012a.

SCHNEIDER, V. E.; PERESIN, D.; TRENTIN, A. C.; BORTOLIN, T. A.; SAMBUICHI, R. H. R. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA Brasília, 2012b.

SCIUTO, D. LO. **Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicanase**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Setor de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SHARMA, A. S.; KAUR, H. Au NPs@ polystyrene resin for mild and selective aerobic oxidation of 1,4 dioxane to 1,4 dioxan-2-ol. **Catalysis Communications**, v. 90, p. 56–59, 2017.

SHI, J.; LI, J. Metabolites and chemical group changes in the wood-forming tissue of *Pinus koraiensis* under inclined conditions. **BioResources**, v. 7, n. 3, p. 3463–3475, 2012.

SHI, L.; YU, H.; DONG, T.; KONG, W.; KE, M.; MA, F.; ZHANG, X. Biochemical and molecular characterization of a novel laccase from selective lignin-degrading white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 1097–1106, 2014.

SHIMIZU, J. Y. **Pinus na Silvicultura Brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification , biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 49–57, 2013.

SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 353–362, fev. 2012.

SILVA, R. F.; SILVA, G. L.; SILVA, P. T. S.; SILVA, V. L. Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto. **Rev. Virtual Quim**, v. 8, n. 3, p. 702–715, 2016.

SILVA, M. S. DA; BITTENCOURT, M. N.; NUNES, C. B.; BANDEIRA, C. T.; RIBEIRO, G. Desempenho de cultivares de trigo em área de várzea - Itaqui / RS. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 7., 2013, Itaqui. **Anais...** Universidade Federal do Pampa, 2013 p. 1–2

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: Wiley, 1991.

SIM, S. F.; MOHAMED, M.; LU, N. A. L. M. I.; SARMAN, N. S. P.; SAMSUDIN, S. N. S. Computer-assisted analysis of fourier transform infrared (FTIR) spectr for characterization of various treated and untreated agriculture biomass. **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 5367–5380, 14 set. 2012.

SIMÕES, C. P. P. **Avaliação operacional e remoção de bisfenol-A no tratamento de água por diferentes tipos de membranas: Avaliação em escala piloto**. 202 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Setor de Eng. Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SINGH, R.; HU, J.; REGNER, M. R.; ROUND, J. W.; RALPH, J.; SADDLER, J. N.; ELTIS, L. D. Enhanced delignification of steam-pretreated poplar by a bacterial laccase. **Scientific reports**, v. 7, p. 42121, 7 fev. 2017.

SOARES, A. F. S.; LEÃO, M. M. D. Contaminação dos mananciais por micropoluentes e a precária remoção desses contaminantes nos tratamentos convencionais de água para potabilização. **Assuntos Gerais Doutrina Internacional**, v. 14, n. 24, p. 36–85, 2015.

SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; RAIMBAULT, M.; SOCCOL, C. R. A novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 695–699, 2000.

SOARES, T. **Avaliação da eficiência de tratamentos com radiação UV e UV/H₂O na degradação de micropoluentes orgânicos**. 125 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Meio Ambiente Urbano e Industrial) - Setro de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Universidade de Stuttgart - Alemanha e SENAI-PR, Curitiba, 2011.

SODRÉ, F. F. Interferentes endócrinos como contaminantes emergentes : Uma questão de saúde pública. **Artigos Temáticos do AQQUA**, v. 1, p. 1–8, 2012.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Origem E Destino De Interferentes Endócrinos Em Águas Naturais. **Caderno Temático**, v. 6, 2007.

SOUZA, M. B. **Estudo curitibano de investigação do ambiente e reprodução (CUIDAR): Avaliação da exposição gestacional a desreguladores endócrinos ambientais**. 150 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

SPINELLI, D.; FATARELLA, E.; DI MICHELE, A.; POGNI, R. Immobilization of fungal (Trametes versicolor) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 218–223, 2013.

SPOHR, D. L.; CIRIO, E.; PIZZOLATO, T. M.; RUSCHEL, C. K. Utilização de microrganismos na degradação de hormônios estrógenos. **Revista Liberato**, v. 15, n. 24, p. 105–212, 2014.

SUMPTER, J. P. Pharmaceuticals in the Environment: Moving from a Problem to a Solution. In: K. KÜMMERER; M. HEMPEL (Eds.). . **Green and Sustainable Pharmacy**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 11–22 .

SWERTS, M. P.; ESTEVES, P. J.; CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C. DOS. Pré-tratamento sob pressão atmosférica visando ao aumento da digestibilidade enzimática de bagaço de cana-de-açúcar usando glicerol em meio ácido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, XX, 2014. **Anais...** Florianópolis: COBEQ, 2014 p. 1–8

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Setor de Engenharia Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, abr. 2006.

THIRIBHUVANAMALA, G.; KALAISELVI, G.; PARTHASARATHY, S.; ANUSHA, B. Induction of lignolytic enzyme activities in different agro residues by the white rot fungi, *Pleurotus sajjar-caju*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 2, p. 89–94, 2017.

TINOCO, R.; ACEVEDO, A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 531–540, 2011.

TORRES-DUARTE, C.; VIANA, M. T.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Laccase-Mediated Transformations of Endocrine Disrupting Chemicals Abolish Binding Affinities to Estrogen Receptors and Their Estrogenic Activity in Zebrafish. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 864–876, 2 out. 2012.

UZAN, E.; NOUSIAINEN, P.; BALLAND, V.; SIPILA, J.; PIUMI, F.; NAVARRO, D.; ASTHER, M.; RECORD, E.; LOMASCOLO, A. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 2199–2213, 1 nov. 2009.

VALLE, J. S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; OLIVEIRA, A. C. C.; TAVARES, M. F.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; SOCCOL, C. R. Effect of different compounds on the induction of laccase production by *Agaricus blazei*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15882–15891, 2015.

VALLE, J. S. DO. **Produção, identificação e caracterização molecular de lacases de *Agaricus blazei* obtidas por fermentação de resíduos agroindustriais**. 171 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

VASINA, D. V.; MUSTAFAEV, O. N.; MOISEENKO, K. V.; SADOVSKAYA, N. S.; GLAZUNOVA, O. A.; TYURIN, A. A.; FEDOROVA, T. V.; PAVLOV, A. R.; TYAZHELOVA, T. V.; GOLDENKOVA-PAVLOVA, I. V.; KOROLEVA, O. V. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction. **Biochimie**, v. 116, p. 154–164, 2015.

VEIGA-LOPEZ, A.; SINGER, K.; LUMENG, C. N.; PADMANABHAN, V. Interaction of Prenatal Bisphenol-A Treatment and Postnatal Overfeeding on Insulin Sensitivity and Inflammatory Pathways in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Depots. In: THE ENDOCRINE SOCIETY'S ANNUAL MEETING AND EXPO, J95., 2013, San Francisco. **Anais...** San Francisco: Physiological Impacts of Endocrine Disrupting Chemicals, 2013 p. 38

VERLIEFDE, A.; CORNELISSEN, E.; AMY, G.; BRUGGEN, B. VAN DER; DIJK, H. VAN. Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration. **Environmental Pollution**, v. 146, p. 281–289, 2007.

VILAR, F. C. M. **Comparação entre diferentes métodos para determinação de lignina em tecidos vegetais**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

WANG, B.; SHEN, X.-J.; WEN, J.-L.; XIAO, L.; SUN, R.-C. Evaluation of organosolv pretreatment on the structural characteristics of lignin polymers and follow-up enzymatic hydrolysis of the substrates from Eucalyptus wood. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 447–459, 2017.

WANG, F.; HU, J. H.; GUO, C.; LIU, C. Z. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 602–605, 2014.

XIN, F.; GENG, A. Utilization of horticultural waste for laccase production by *Trametes versicolor* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 235–246, 2011.

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, v. 104, p. 801–809, 2013.

YOSHIDA, H. LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. **J. Chem. Soc. Trans.**, v. 43, n. 0, p. 472–486, 1883.

YOUSHUANG, Z.; HAIBO, Z.; MINGLE, C.; ZHENZHEN, W.; FENG, H.; PEIJI, G. Production of a thermostable metal-tolerant laccase from *Trametes versicolor* and its application in dye decolorization. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 1035, p. 1027–1035, 2011.

ZAMPIERI, L. A. **Bioxidação fúngica de valenceno a nootkatona, bioflavorizante de grapefruit**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Setor de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

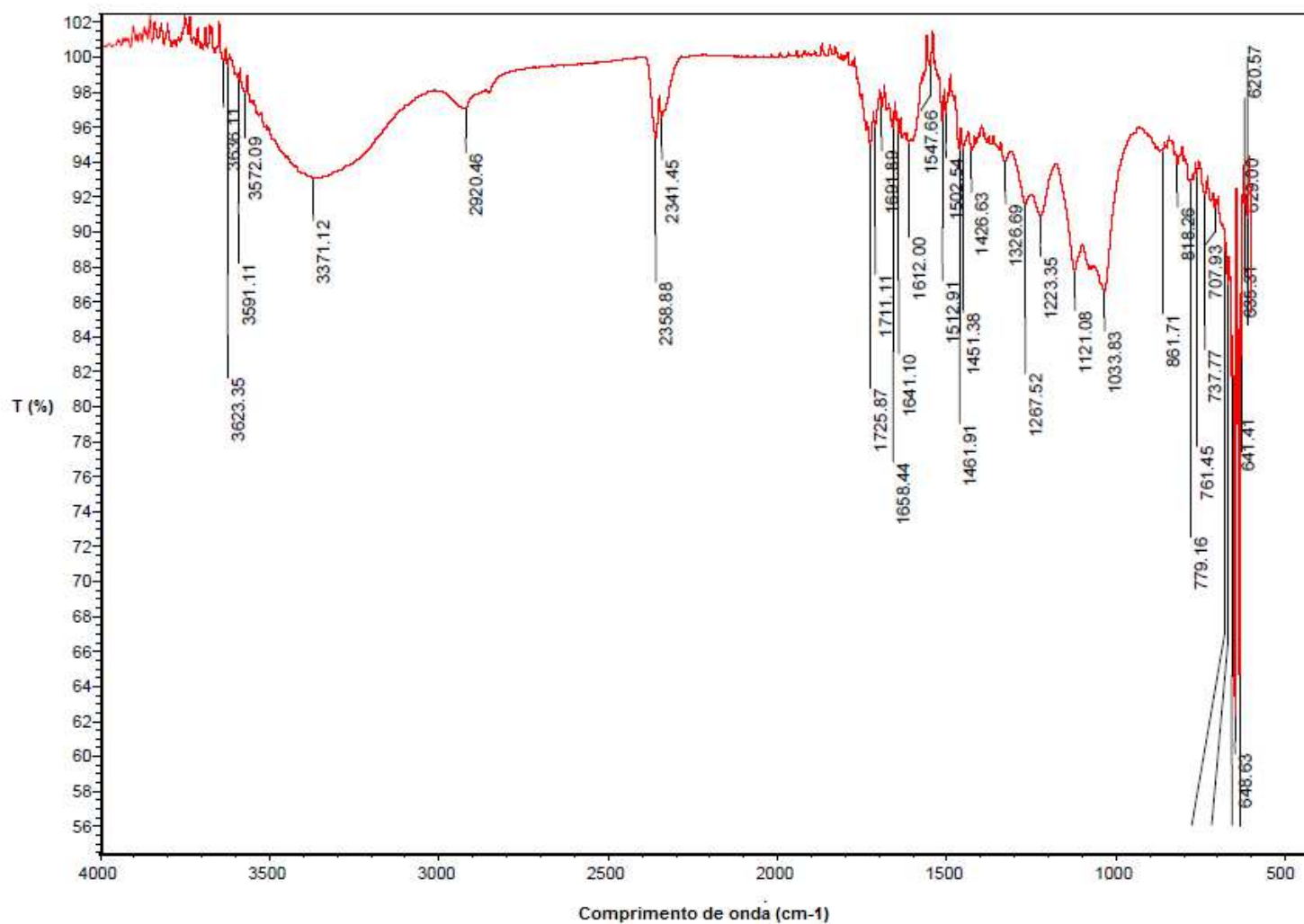
ZHANG, T.; SUN, H.; KANNAN, K. Blood and Urinary Bisphenol A Concentrations in Children, Adults, and Pregnant Women from China: Partitioning between Blood and Urine and Maternal and Fetal Cord Blood. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 9, p. 4686–4694, 2013.

ZHAO, J.; XIUWEN, W.; HU, J.; LIU, Q.; SHEN, D.; XIAO, R. Thermal degradation of softwood lignin and hardwood lignin by TG-FTIR and Py-GC/MS. **Polymer Degradation and Stability**, v. 108, p. 133–138, 2014.

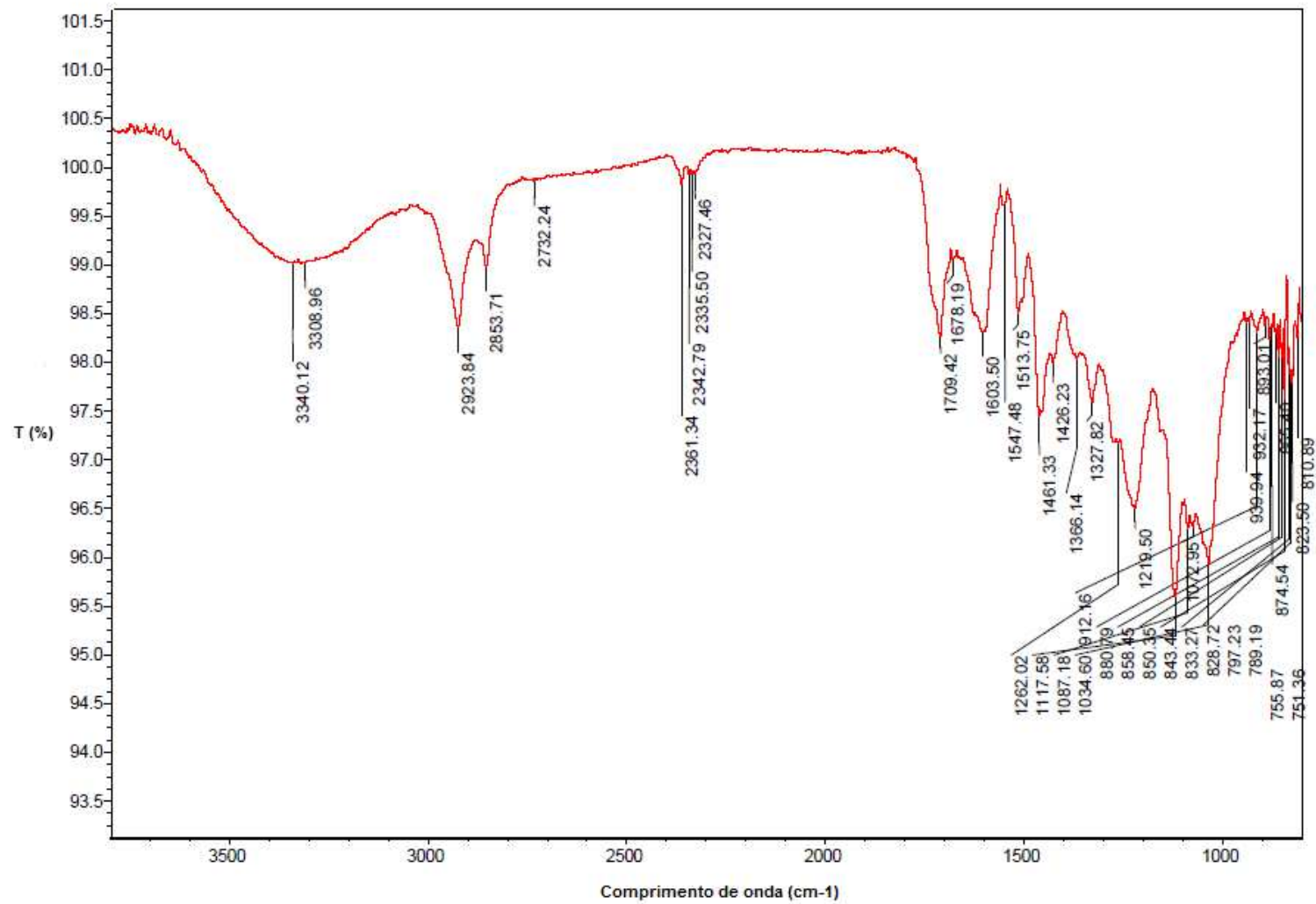
ZHAO, J.; YING, G.; WANG, L.; YANG, J.; YANG, X.; YANG, L.; LI, X. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography – negative chemical ionization – mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 2, p. 962–974, 2009.

ZHU, C.; BAO, G.; HUANG, S. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ATCC 52857) induced through yeast extract and copper. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 2, p. 270–276, 3 mar. 2016.

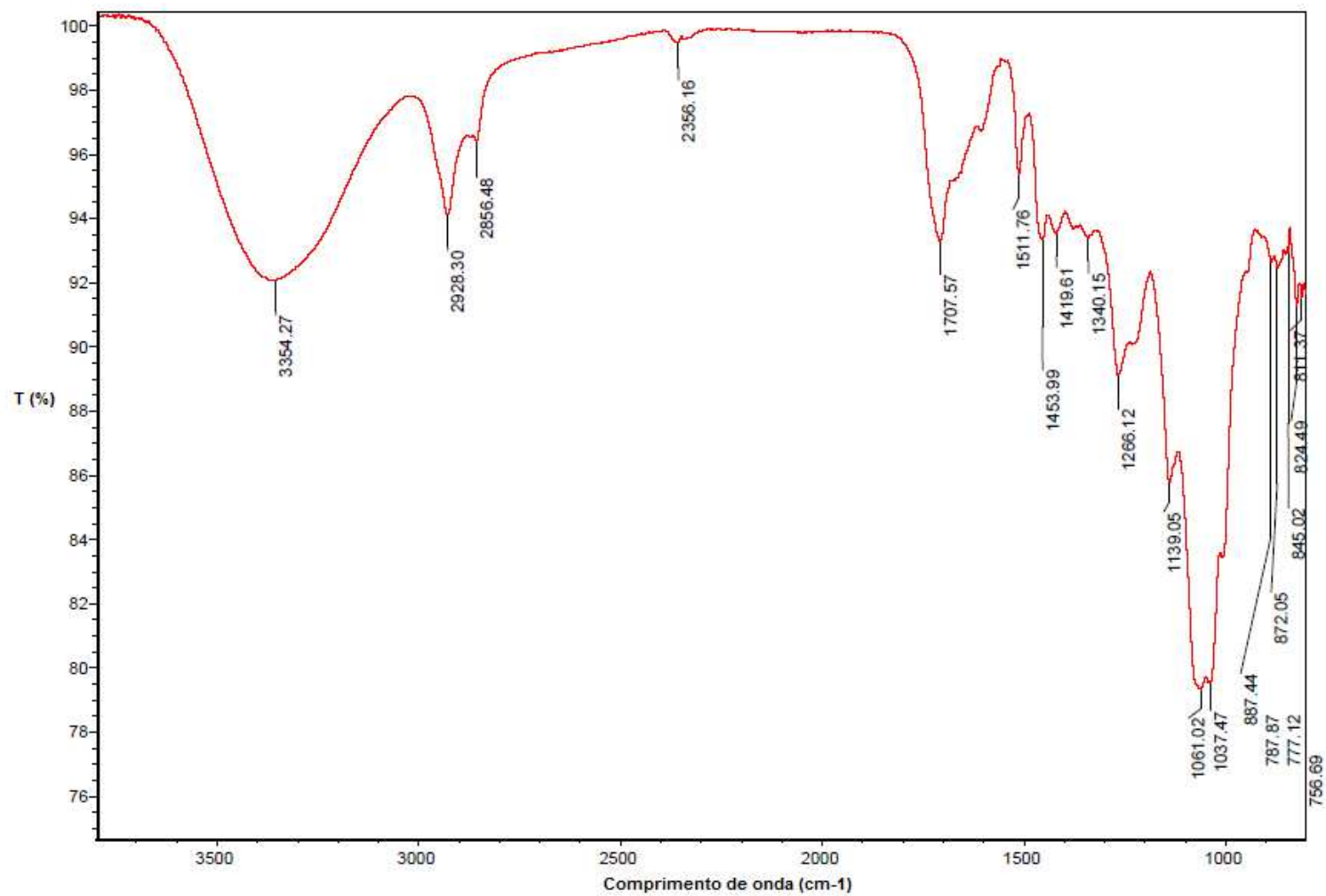
APÊNDICE A – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE BRACATINGA



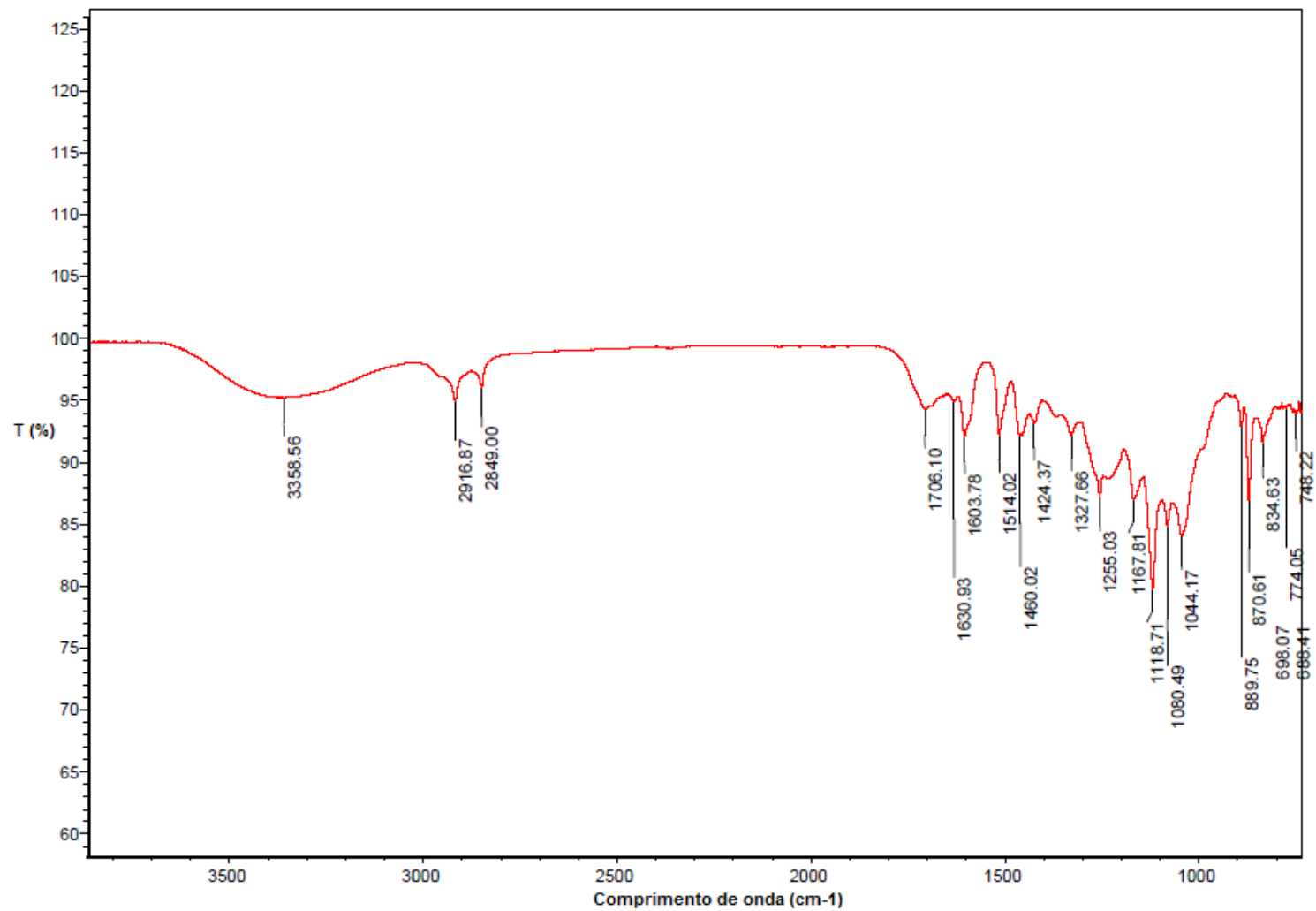
APÊNDICE B – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE PEROBA



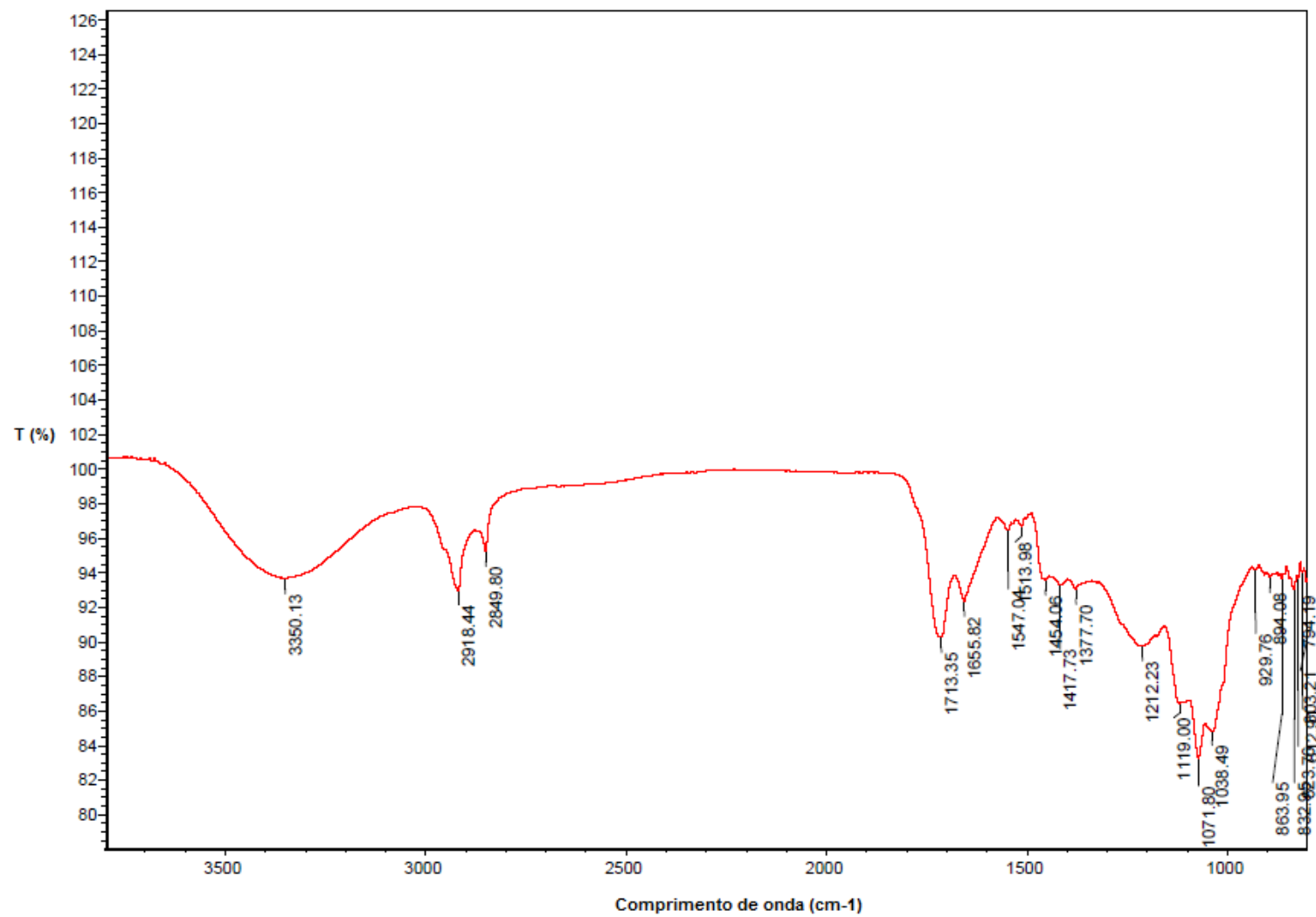
APÊNDICE C – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE PINUS



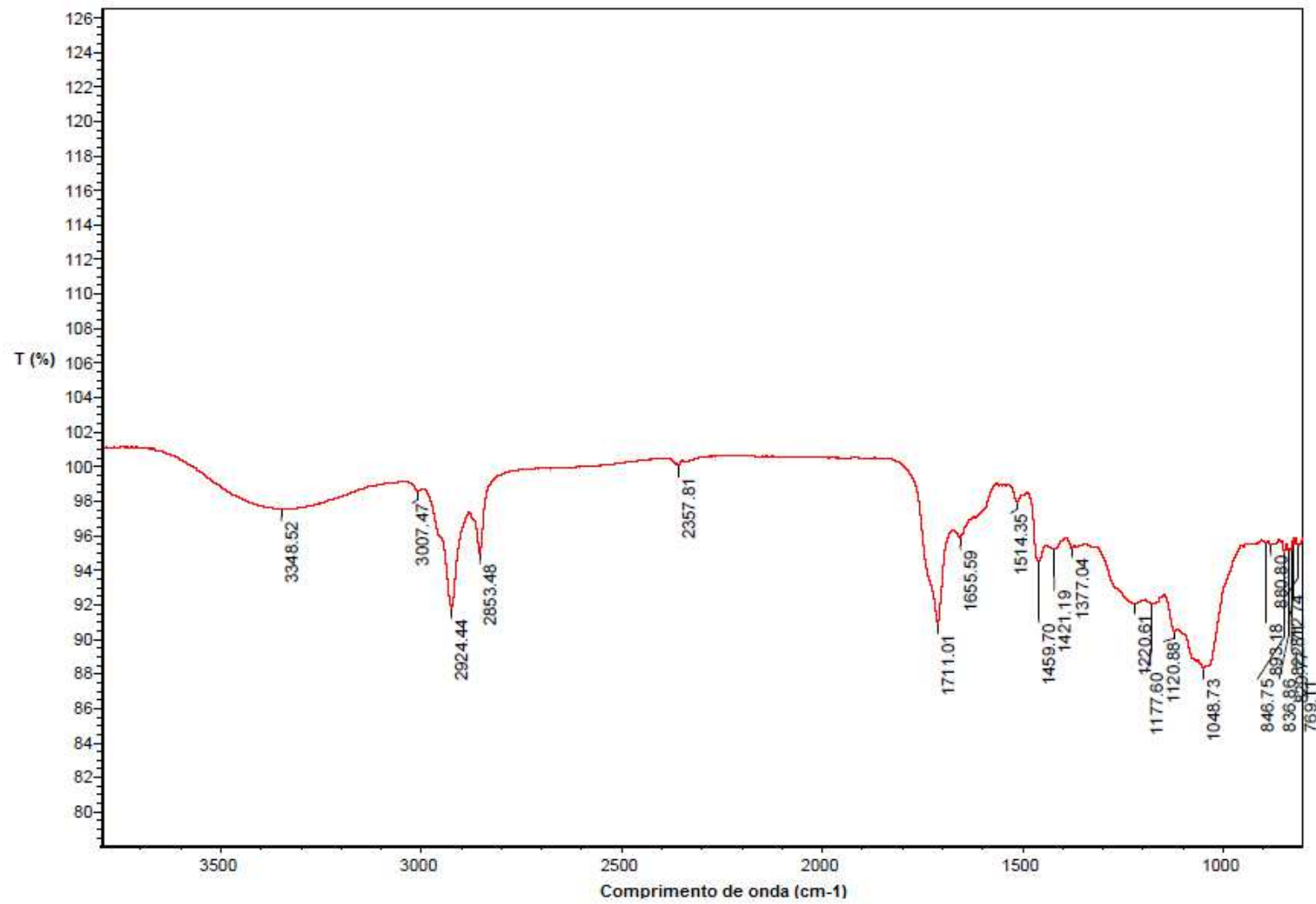
APÊNDICE D – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR



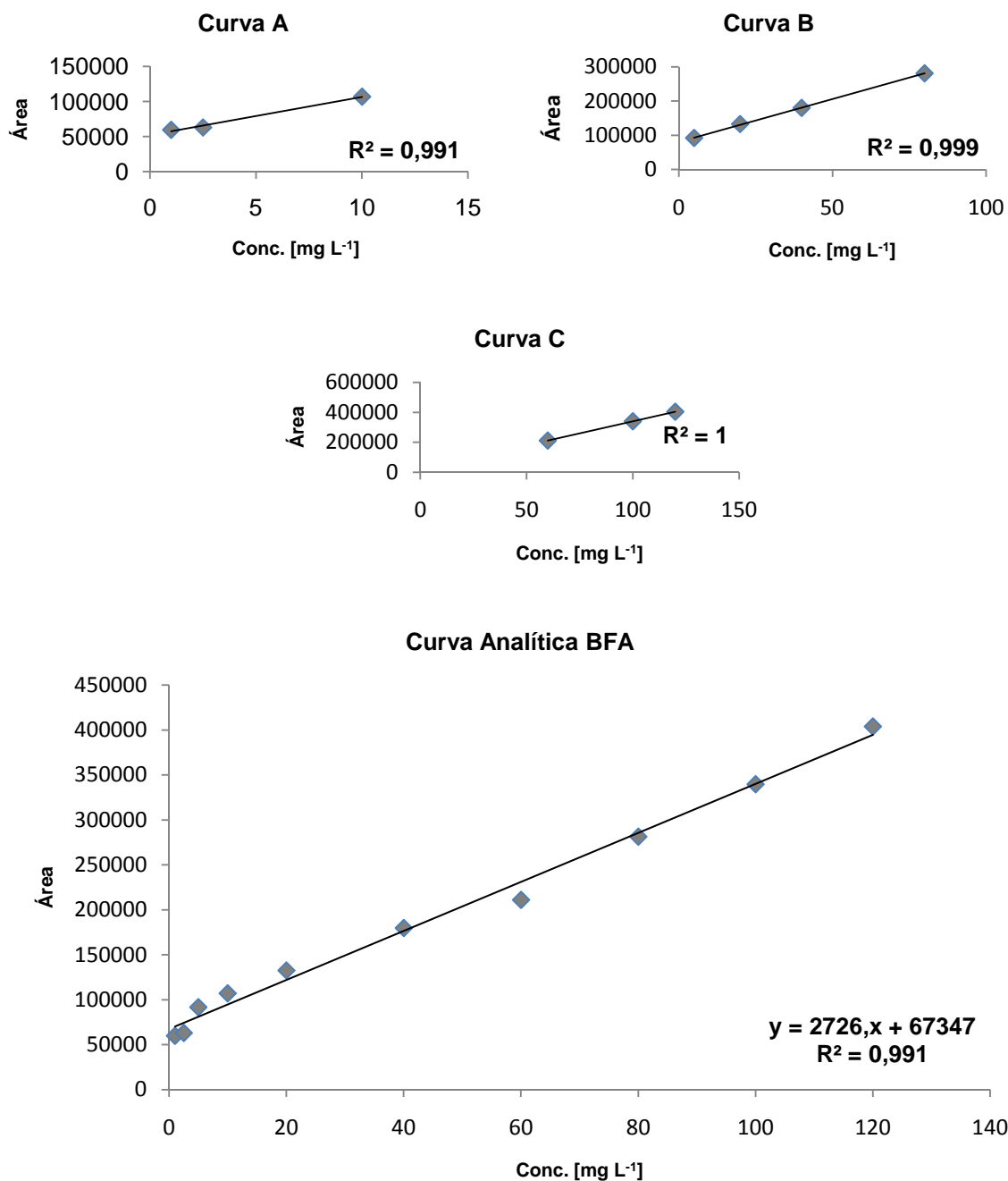
APÊNDICE E – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE CASCA DE SOJA



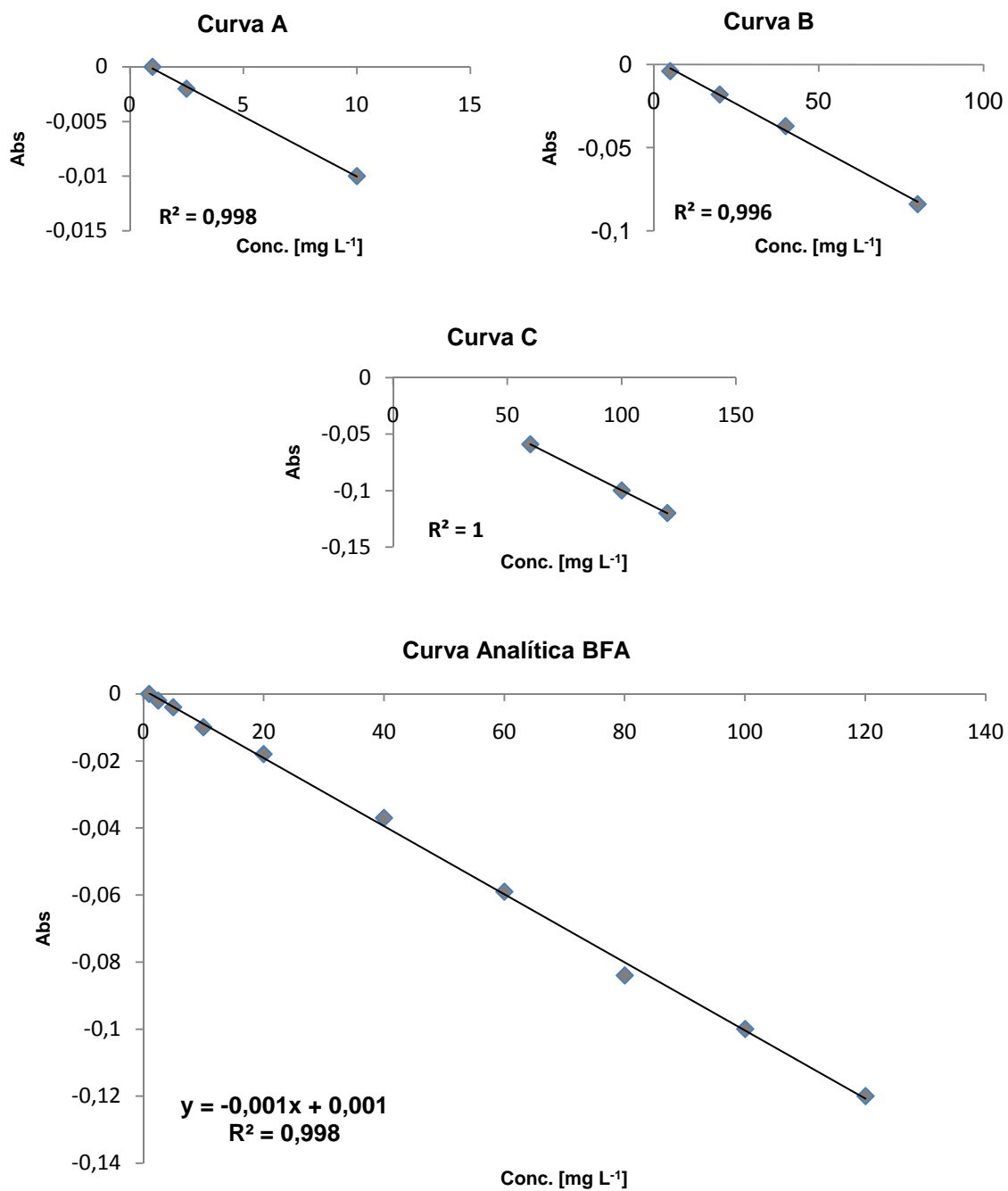
APÊNDICE F – ESPECTRO FTIR DO EXTRATO BRUTO DE LIGNINA DE CASCA DE TRIGO



APÊNDICE G – CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO BISFENOL A POR HPLC-DAD



**APÊNDICE H - CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO BISFENOL A
POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVATIVA UV-VIS DE
PRIMEIRA ORDEM**



APÊNDICE I - CROMATOGRAMA DA BIORREMEDIAÇÃO DO BFA POR LACASE DE *Trametes* sp. APÓS 10 H DE REAÇÃO OBTIDO POR HPLC-DAD

